

**Rôle des neurostéroïdes endogènes dans la régulation des  
processus neurodégénératifs impliqués dans la maladie  
d'Alzheimer et dans l'étiologie des douleurs neuropathiques.**

**Inauguraldissertation**

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie  
vorgelegt der  
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Basel

von

**Véronique SCHAEFFER**  
**aus Strasbourg, FRANCE**

Strasbourg, 2009

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Auf Antrag von

**Prof. R. MARIN**, Professor, University La Laguna, Santa Cruz de Tenerife, Spain

**Prof. H. REICHERT**, Professor, University Basel, Suisse

**Prof. D. AUNIS**, Directeur de Recherche, INSERM, Strasbourg, France

**Prof. R.C. MELCANGI**, Professor, University of Milan, Italie

**Prof. A. ECKERT**, Professor, University Basel, Suisse

**Prof. A.G. MENSAH-NYAGAN**, Professor University Louis Pasteur, Strasbourg, France

Basel, den 23. November 2007

Prof. Dr. Hans-Peter Hauri

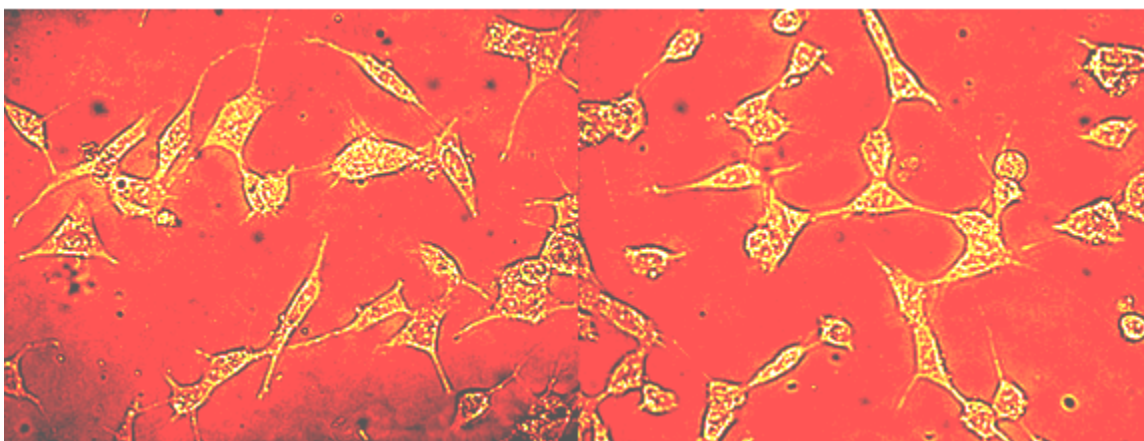
**THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR STRASBOURG I, FRANCE**

**Discipline : Sciences du vivant**

**Spécialité : Neurosciences**

**EN COTUTELLE AVEC L'UNIVERSITE DE BALE, SUISSE**

**Rôle des neurostéroïdes endogènes dans la régulation des  
processus neurodégénératifs impliqués dans la maladie  
d'Alzheimer et dans l'étiologie des douleurs neuropathiques.**



**Présentée par  
Véronique Schaeffer**

**Soutenue le 28 Novembre 2007**

**JURY**

<b>Rapporteur externe</b>	<b>Mme R. MARIN</b> , Professeur, Université de La Laguna, Santa Cruz de Ténérife, Espagne
<b>Rapporteur externe</b>	<b>M. H. REICHERT</b> , Professeur, Université de Bâle, Suisse
<b>Rapporteur interne</b>	<b>M. D. AUNIS</b> , Directeur de Recherche, INSERM, Strasbourg, France
<b>Examineur</b>	<b>M. R.C. MELCANGI</b> , Professeur, Université de Milan, Italie
<b>Co-directeur de thèse</b>	<b>Mme A. ECKERT</b> , Professeur, Université de Bâle, Suisse
<b>Directeur de thèse</b>	<b>M. A.G. MENSAH-NYAGAN</b> , Professeur ULP, Strasbourg, France

## **REMERCIEMENTS**

*Je souhaite exprimer mes remerciements à Madame le Professeur Raquel Marin, Monsieur le Professeur Roberto Melcangi, Monsieur le Directeur de Recherche Dominique Aunis et Monsieur le Professeur Heinrich Reichert d'avoir accepté d'être les membres du jury de ma thèse. Je les remercie de m'accorder le privilège d'avoir un échange scientifique avec eux.*

*Je tiens également à remercier chaleureusement et sincèrement le Professeur Ayikoe Guy Mensah-Nyagan de m'avoir offert ce projet de thèse et de m'avoir fait confiance. Je souhaite lui exprimer toute ma gratitude pour son encadrement, ses enseignements, son aide et son soutien. Tout au long de ces années, il m'a patiemment guidée et m'a transmis sa passion pour la recherche. Son investissement, son écoute et sa disponibilité ont été bien au-delà de ce qu'un étudiant peut attendre de son directeur de thèse. Il restera toujours un modèle, un exemple à suivre. Merci pour tout. Sans vous, je n'en serais pas là aujourd'hui et j'espère avoir le plaisir de pouvoir travailler à nouveau avec vous.*

*Je souhaite également remercier le Professeur Anne Eckert, ma co-directrice de thèse, pour son soutien et ses conseils.*

*Un grand merci aussi au Docteur Christine Patte-Mensah pour son soutien, ses enseignements, son investissement et sa bonne humeur communicative.*

*Merci aussi au Docteur Laurence Meyer qui m'a souvent aidée et soutenue. De collègues nous sommes devenues amies. Merci pour tous ces bons moments.*

*Un grand merci aussi à Ginette Baysan pour m'avoir enseigné la culture cellulaire, pour son aide et pour les nombreuses conversations que nous avons eues.*

*Je remercie également les autres membres de l'équipe strasbourgeoise, Christine Venard et Adrien Lacaud, ainsi, que mes collègues suisses, Fides Meyer et Virginie Rhein.*



*A mes parents,*

*A mon frère,*

*Merci pour votre soutien et votre affection sans faille. Merci d'avoir cru en moi  
et de m'avoir soutenue pendant toutes ces années d'étude.*

# SOMMAIRE

<b>REALISATIONS SCIENTIFIQUES EFFECTUEES DANS LE CADRE DE MES ETUDES DOCTORALES .....</b>	<b>7</b>
<b>RESUME .....</b>	<b>10</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>11</b>
<b>ABREVIATIONS .....</b>	<b>12</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX.....</b>	<b>14</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>16</b>
<b>I. Neurodégénérescence et conséquences physiopathologiques ....</b>	<b>17</b>
<b>I.1. Les processus neurodégénératifs .....</b>	<b>17</b>
I.1.1. Définition .....	17
I.1.2. Nécrose .....	17
I.1.2.1. Caractéristiques morphologiques de la nécrose .....	18
I.1.2.2. Mécanismes nécrotiques .....	19
I.1.3. Apoptose .....	20
I.1.3.1. Caractéristiques morphologiques de l'apoptose .....	20
I.1.3.2. Voies apoptotiques .....	22
I.1.3.2.1. Voie apoptotique extrinsèque.....	22
I.1.3.2.2. Voie apoptotique intrinsèque .....	24
I.1.3.3. Les caspases .....	28
I.1.4. Autophagie .....	31
I.1.4.1. Caractéristiques morphologiques de l'autophagie .....	31
I.1.4.2. Mécanismes moléculaires régulant l'autophagie .....	32
<b>I.2. Conséquences physiopathologiques .....</b>	<b>35</b>

<b>II. Maladie d'Alzheimer .....</b>	<b>36</b>
<b>II.1. Le peptide <math>\beta</math>-amyloïde.....</b>	<b>37</b>
II.1.1. Présentation .....	37
II.1.2. Processus neurodégénératifs et peptide $\beta$ -amyloïde .....	40
<b>II.2. La protéine tau .....</b>	<b>43</b>
II.2.1. Présentation de la protéine tau .....	43
II.2.2. Tau dans les dégénérescences neurofibrillaires .....	45
II.2.3. Les Tauopathies .....	47
II.2.4. Processus neurodégénératifs et protéine tau .....	48
<b>III. Douleurs neuropathiques.....</b>	<b>51</b>
<b>III.1. Définition .....</b>	<b>51</b>
<b>III.2. Processus neurodégénératifs et douleur neuropathique .....</b>	<b>53</b>
III.2.1. Modèles de lésion de nerf et douleur neuropathique.....	54
III.2.2. Modèle de neuropathie diabétique : injection de streptozotocine .....	57
III.2.3. Modèles anti-cancéreux.....	59
III.2.4. Modèle ischémique.....	61
III.2.5. Modèle de traumatisme médullaire ou section de moelle épinière .....	62
<b>IV. Neurostéroïdes et contrôle des processus neurodégénératifs .....</b>	<b>63</b>
<b>IV.1. Présentation du concept des neurostéroïdes.....</b>	<b>63</b>
IV.1.1. Définition .....	63
IV.1.2. Mécanismes d'action.....	66
IV.1.2.1. Actions génomiques .....	66
IV.1.2.2. Actions non génomiques .....	69
<b>IV.2. Données bibliographiques en faveur d'un rôle neuroprotecteur des neurostéroïdes.....</b>	<b>70</b>
<b>IV.3. Implication potentielle des neurostéroïdes dans la maladie d'Alzheimer .....</b>	<b>73</b>

IV.4. Action potentielle des neurostéroïdes dans le contrôle des douleurs neuropathiques .....	74
<b>V. Descriptif du projet de thèse .....</b>	<b>76</b>
V.1. Objectifs du programme de recherche .....	76
V.2. Modèles expérimentaux utilisés .....	78
<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>80</b>
I. Substances pharmacologiques et produits chimiques.....	81
II. Culture cellulaire .....	81
III. Analyse microscopique de la morphologie des cellules SH-SY5Y.....	82
IV. Etude de la viabilité des cellules SH-SY5Y : <i>MTT reduction assay</i> ....	82
IV.1. Principe de la technique de MTT .....	82
IV.2. Protocole .....	83
IV.2.1. Etude de la survie cellulaire en présence de peptide $\beta$ -amyloïde .....	83
IV.2.2. Etude de la survie cellulaire en présence de peroxyde d'hydrogène .....	84
V. Etude de l'activité biologique des enzymes de synthèse des neurostéroïdes <i>in vitro</i> : conversion de la [ $^3$ H]PREG en [ $^3$ H]neurostéroïdes. ....	85
V.1. Incorporation de la prégnénolone tritiée dans les cellules SH-SY5Y (technique de pulse-chase) .....	85
V.2. Caractérisation des neurostéroïdes néosynthétisés par le couplage HPLC-Flo/One. ....	86
V.3. Quantification de la biosynthèse des neurostéroïdes et analyse statistique. ....	88

<b>VI. Analyse de l'expression du gène codant l'aromatase par couplage Reverse Transcription - PCR quantitative en temps réel.....</b>	<b>88</b>
<b>VI.1. Principe général d'une PCR .....</b>	<b>88</b>
<b>VI.2. Principe de la PCR quantitative en temps réel ou rtPCR.....</b>	<b>89</b>
<b>VI.3. Protocole .....</b>	<b>91</b>
VI.3.1. Extraction des ARN et RT .....	91
VI.3.2. PCR quantitative en temps réel.....	95
<b>VII. Analyse comportementale de la sensibilité thermique et mécanique des rats témoins et neuropathiques .....</b>	<b>97</b>
<b>VII.1. Animaux .....</b>	<b>97</b>
<b>VII.2. Le test du PLANTAR.....</b>	<b>99</b>
<b>VII.3. Le test des FILAMENTS DE VON FREY .....</b>	<b>101</b>
<b>VII.4. Prétests et homogénéisation des groupes .....</b>	<b>102</b>
<b>VII.5. Mesure de la sensibilité thermique et mécanique.....</b>	<b>102</b>
<b>VIII. Recherche de la présence d'apoptose dans les DRG et la moelle épinière par la technique de TUNEL .....</b>	<b>102</b>
<b>VIII.1. Principe de la technique de TUNEL .....</b>	<b>102</b>
<b>VIII.2. Préparation des coupes.....</b>	<b>103</b>
<b>VIII.3. Protocole .....</b>	<b>104</b>
<b>IX. Etude <i>in vitro</i> de l'effet de l'apoptose sur la synthèse des neurostéroïdes dans les DRG .....</b>	<b>104</b>

## **RESULTATS.....106**

### **I. Modulation de la biosynthèse des neurostéroïdes dans les neuroblastomes humains par des protéines clés de la maladie d'Alzheimer ..... 107**

#### **I.1. Analyses morphologiques..... 108**

#### **I.2. Neurostéroïdogénèse dans les cellules SH-SY5Y ..... 108**

### **II. Analyse comparative des effets des concentrations physiologiques et toxiques des peptides $\beta$ -amyloïdes 1-42 et 25-35 sur la neurostéroïdogénèse et la survie des neuroblastomes humains ..... 125**

#### **II.1. Effets d' $A\beta_{1-42}$ et $A\beta_{25-35}$ sur la viabilité des cellules SH-SY5Y ..... 126**

#### **II.2. Analyse comparative des effets d' $A\beta_{1-42}$ et $A\beta_{25-35}$ sur la neurostéroïdogénèse 126**

### **III. Régulation sélective de la neurostéroïdogénèse dans les neuroblastomes humains en condition de stress oxydatif induit par le peroxyde d'hydrogène ..... 149**

#### **III.1. Effet du stress oxydatif induit par le $H_2O_2$ sur la viabilité cellulaire..... 150**

#### **III.2. Effet du stress oxydatif sur la biosynthèse des neurostéroïdes..... 150**

#### **III.3. Effet du stress oxydatif sur l'expression du gène de l'aromatase ..... 151**

#### **III.4. Effet protecteur de l'œstradiol contre la mort cellulaire induite par l' $H_2O_2$ ..... 151**

### **IV. Modifications de la neurostéroïdogénèse évoquées par l'apparition de sites apoptotiques dans les ganglions rachidiens de rats soumis à une douleur neuropathique sciatique..... 194**

#### **IV.1. Evaluation comportementale des seuils de sensibilité nociceptive ..... 194**

IV.2. Identification des sites apoptotiques dans les ganglions rachidiens et la moelle épinière des rats neuropathiques .....	195
IV.3. Analyse des changements intervenant dans la neurostéroïdogénèse au moment de l'apparition des sites apoptotiques dans les ganglions rachidiens des rats neuropathiques .....	195
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>224</b>
I. Régulation de la neurostéroïdogénèse dans les neuroblastomes humains par des protéines clés de la maladie d'Alzheimer.....	225
II. Effets des concentrations physiologiques et toxiques des peptides $A\beta_{1-42}$ et $A\beta_{25-35}$ sur la neurostéroïdogénèse et la survie des neuroblastomes humains.....	231
III. Modification de la neurostéroïdogénèse dans les neuroblastomes humains induite par le stress oxydatif .....	235
IV. Genèse d'apoptose et modifications de la neurostéroïdogénèse dans les ganglions rachidiens de rats soumis à une douleur neuropathique sciatique.....	239
<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>243</b>
<b>PERSPECTIVES .....</b>	<b>246</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>253</b>

# REALISATIONS SCIENTIFIQUES EFFECTUEES DANS LE CADRE DE MES ETUDES DOCTORALES

(octobre 2004 – Novembre 2007)

## I. Publications dans des journaux à comité de lecture.

(1) **SCHAEFFER V.**, PATTE-MENSAH C., ECKERT A. and MENSAH-NYAGAN A.G. Modulation of neurosteroid production in human neuroblastoma cells by Alzheimer's disease key proteins. *Journal of Neurobiology*, 66(8):868-881, 2006.

(2) PATTE-MENSAH C., KIBALY C., BOUDARD D., **SCHAEFFER V.**, BEGLE A., SAREDI S., MEYER L. and MENSAH-NYAGAN A.G. Neurogenic pain and steroid synthesis in the spinal cord. *Journal of Molecular Neuroscience*, 28(1):17-34, 2006.

(3) MENSAH-NYAGAN A.G., SAREDI S., **SCHAEFFER V.**, KIBALY C., MEYER L., MELCANGI R.C. and PATTE-MENSAH C. Assessment of neuroactive steroid formation in diabetic rat spinal cord using High Performance Liquid Chromatography and Continuous Flow Scintillation Detection. *Neurochemistry International*. Sous presse. Déjà publié online [doi:10.1016/j.neuint.2007.06.010](https://doi.org/10.1016/j.neuint.2007.06.010).

(4) MENSAH-NYAGAN A.G., KIBALY C., **SCHAEFFER V.**, VENARD C., MEYER L. and PATTE-MENSAH C. Endogenous steroid production in the spinal cord and potential involvement in neuropathic pain modulation. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. Sous presse.

(5) **SCHAEFFER V.**, PATTE-MENSAH C., ECKERT A. and MENSAH-NYAGAN A.G. Selective regulation of neurosteroid biosynthesis in human neuroblastoma cells under hydrogen peroxide-induced oxidative stress conditions. *Neuroscience*. Sous presse. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2007.11.032

(6) **SCHAEFFER V.**, PATTE-MENSAH C., ECKERT A. and MENSAH-NYAGAN A.G. Dose-dependent and sequence sensitive effects of  $\beta$ -amyloid peptide on neurosteroidogenesis in human neuroblastoma cells. *Soumis*.

(7) MEYER L., VENARD C., **SCHAEFFER V.**, PATTE-MENSAH C. and MENSAH-NYAGAN A.G. The biological activity of 3 $\alpha$ -hydroxysteroid oxido-reductase in the spinal cord regulates thermal and mechanical pain thresholds after sciatic nerve injury. *Soumis*.



(8) **SCHAEFFER V.**, PATTE-MENSAH C., ECKERT A. and MENSAH-NYAGAN A.G. Sciatic nerve injury induces apoptosis of dorsal root ganglion satellite cells and selectively modifies neurosteroidogenesis in sensory neurons. *En préparation*.

## II. Publication dans un journal sans comité de lecture.

MENSAH-NYAGAN A.G., KIBALY C., MEYER L., **SCHAEFFER V.**, VENARD C., PATTE-MENSAH C. Neurostéroïdogenèse dans la moelle épinière et modulation de la sensibilité nociceptive au cours de la douleur neurogène. *Douleurs*, 7(HS2) : 14-16, 2006.

## III. Communications orales.

(1) Biosynthèse de stéroïdes sexuels dans les neuroblastomes humains : modulation par la transfection de protéines contrôlant la neurodégénérescence.

*Journée scientifique de l'IFR 37 de Neurosciences sur le thème Stéroïdes sexuels et système nerveux*. Strasbourg, France. May 23, 2006.

(2) Action potentielle des neurostéroïdes dans la prévention et le traitement des maladies neurodégénératives.

*Workshop Neurex « Maladie d'Alzheimer : le point sur les recherches »*. Strasbourg, France. October 7, 2006.

(3) Endogenous neurosteroids and neuroprotection in Alzheimer's disease and chronic pain.

*Neurobiology and Chronobiology Laboratories Meeting*. Basel, Switzerland. May 8, 2007.

## IV. Abstracts publiés dans le cadre de congrès nationaux et internationaux.

(1) PATTE-MENSAH C., KIBALY C., BOUDARD D., **SCHAEFFER V.**, BEGLE A., SAREDI S. and MENSAH-NYAGAN A.G. Effect of chronic pain on the local production of neurosteroids in spinal neural networks. *International Meeting Steroids and Nervous System*. Torino, Italy, February 2005.

(2) PATTE-MENSAH C., KIBALY C., **SCHAEFFER V.**, BOUDARD D., BEGLE A. and MENSAH-NYAGAN A.G. Expression and biological activity of cytochrome P450scc in the spinal cord under neuropathic pain state. *7<sup>ème</sup> Colloque de la Société des Neurosciences*, Lille, France, May 17-20, 2005.

(3) **SCHAEFFER V.**, PATTE-MENSAH C., ECKERT A. and MENSAH-NYAGAN A.G. Modulation of neurosteroid production by tau and amyloid precursor protein in human neuroblastoma cells. *Neurex Annual Meeting*, Basel, Switzerland, March 29, 2006.

(4) **SCHAEFFER V.**, PATTE-MENSAH C., ECKERT A. and MENSAH-NYAGAN A.G. Expression of Alzheimer's disease key proteins modifies neurosteroid production in human neuroblastoma cells. *Society for Neuroscience Annual Meeting*, Atlanta, Georgia, USA, October 14-18, 2006.

(5) **SCHAEFFER V.**, PATTE-MENSAH C., ECKERT A. and MENSAH-NYAGAN A.G. Effects of Beta amyloid peptide 1-42 and oxidative stress on neurosteroid formation in human neuroblastoma cells. *4<sup>th</sup> International Meeting Steroids and Nervous System*, Torino, Italy, February 17-21, 2007.

(6) MENSAH-NYAGAN A.G., MEYER L., KIBALY C., **SCHAEFFER V.** and PATTE-MENSAH C. Neurosteroids and nociceptive sensitivity in neuropathic rats. *4<sup>th</sup> International Meeting Steroids and Nervous System*, Torino, Italy, February 17-21, 2007.

## V. Prix scientifique.

**Prix du meilleur poster**, *4<sup>th</sup> International Meeting Steroids and Nervous System*, Torino, Italy, February 17-21, 2007.

## RESUME

Les neurostéroïdes sont des stéroïdes synthétisés par les neurones et/ou les cellules gliales. Des données pharmacologiques récentes suggèrent que les neurostéroïdes seraient impliqués dans la régulation des processus neurodégénératifs. Toutefois, il n'existe aucune preuve montrant que la survie et la protection des cellules nerveuses contre la dégénérescence dépendent de leur capacité intrinsèque à produire des stéroïdes endogènes. Nous avons donc émis l'hypothèse que si les neurostéroïdes sont des molécules endogènes indispensables à la vie des cellules nerveuses, leur biosynthèse devrait être modifiée ou perturbée par les facteurs clés induisant la neurodégénérescence. Pour vérifier notre hypothèse, nous nous sommes intéressés aux facteurs pro-dégénératifs intervenant dans l'étiologie de deux neuropathologies hautement invalidantes que sont la maladie d'Alzheimer et la douleur neuropathique chronique.

Dans l'axe de recherche relatif à l'Alzheimer, des études microscopiques et protéomiques nous ont permis de constater que la transfection des cellules humaines SH-SY5Y par des ADNc codant la protéine native hTau40, la protéine Tau mutée P301L ou l'APP provoque une surexpression de ces protéines dans les neuroblastomes mais ne modifie pas la morphologie des cellules. En revanche, la neurostéroïdogenèse a complètement été perturbée dans les cellules SH-SY5Y par la transfection des protéines précitées. En effet, la combinaison des techniques de pulse-chase, d'HPLC et de détection en flux continu (Flo/One) a révélé que la surexpression de hTau40 native stimule fortement la biosynthèse des neurostéroïdes alors que la forme mutée pathogénique Tau P301L est totalement dépourvue d'action sur la neurostéroïdogenèse. L'effet de l'APP varie en fonction du neurostéroïde considéré. Ces résultats démontrent que des facteurs impliqués dans l'induction ou la régulation de la neurodégénérescence modulent la neurostéroïdogenèse dans les neuroblastomes humains. Ils suggèrent que Tau native assure l'intégrité du cytosquelette en stimulant la production de neurostéroïdes neuroprotecteurs. La mutation P301L de Tau entraînerait alors une perte de cette capacité stimulatrice de la neurostéroïdogenèse, ce qui faciliterait la neurodégénérescence. Des concentrations élevées de peptides A $\beta$  sont responsables des plaques amyloïdes dans le cerveau des patients Alzheimer. Néanmoins, de nombreux travaux suggèrent que les doses physiologiques ou nanomolaires (nM) d'A $\beta$  seraient plutôt neuroprotectrices. Nous avons alors réalisé une étude dose-réponse qui a montré que les concentrations nM d'A $\beta_{1-42}$  et d'A $\beta_{25-35}$  n'induisent pas de toxicité des cellules SH-SY5Y alors que la dose de 12  $\mu$ M provoque la mort cellulaire. L'association pulse-chase-HPLC-Flo/One a révélé que les concentrations nM d'A $\beta_{1-42}$  inhibent la production de progestérone mais stimulent celle d'œstradiol à partir du précurseur prégénolone. Les doses nM d'A $\beta_{25-35}$  réduisent aussi la néosynthèse de progestérone mais n'affectent pas la production d'œstradiol dans les neuroblastomes. A 12  $\mu$ M, l'A $\beta_{1-42}$  ou l'A $\beta_{25-35}$  inhibe la biosynthèse de progestérone mais seul l'A $\beta_{1-42}$  réduit la formation d'œstradiol. Les résultats démontrent l'existence d'une action sélective et séquence peptidique dépendante des concentrations nM d'A $\beta$  sur la neurostéroïdogenèse. Le fait que les doses physiologiques ou nM d'A $\beta_{1-42}$  stimulent la biosynthèse du neurostéroïde protecteur œstradiol alors que les concentrations élevées d'A $\beta_{1-42}$  l'inhibent, permet de comprendre que l'A $\beta_{1-42}$  pourrait effectivement être neuroprotecteur ou neurodélétère selon les cas.

Nos résultats montrent aussi que la biosynthèse d'œstradiol à partir de prégénolone est sélectivement inhibée dans les cellules SH-SY5Y 12h après leur exposition au stress oxydatif induit par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, un facteur causal de la neurodégénérescence. Des expériences de RT-PCR en temps réel ont révélé une répression du gène codant l'aromatase (enzyme produisant l'œstradiol) dans les cellules SH-SY5Y 12h après le début du stress oxydatif. Le prétraitement des neuroblastomes avec l'œstradiol les protège contre la mort cellulaire induite par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, suggérant que la biosynthèse d'œstradiol endogène est cruciale pour la viabilité des cellules SH-SY5Y.

Dans le modèle expérimental de douleur neuropathique induite chez le rat par ligature lâche du nerf sciatique, nous n'avons pas détecté d'apoptose (test de TUNEL) dans la moelle épinière jusqu'au 30<sup>ème</sup> jour après la ligature bien que les animaux développaient une hyperalgie thermique et une allodynie mécanique. En revanche, l'apoptose a été observée dans un nombre restreint de cellules satellites gliales dans les ganglions rachidiens ipsilatéraux des rats neuropathiques au 30<sup>ème</sup> jour après constriction du nerf sciatique. Le déclenchement d'apoptose dans les cellules satellites a provoqué une augmentation de la biosynthèse d'œstradiol dans les neurones sensoriels voisins. Ces résultats suggèrent que les neurostéroïdes endogènes participent au contrôle des processus neurodégénératifs dans les ganglions rachidiens.

En conclusion, nos travaux démontrent que les facteurs clés impliqués dans l'étiologie de la maladie d'Alzheimer ou dans l'induction des douleurs neuropathiques modifient significativement et sélectivement les voies de la neurostéroïdogenèse. La production intrinsèque de neurostéroïdes neuroprotecteurs apparaît comme étant indispensable à la survie des cellules nerveuses ou à leur protection contre la dégénérescence car l'inhibition de la biosynthèse de ces neurostéroïdes par les facteurs pro-dégénératifs conduit à la mort cellulaire. Nos résultats ouvrent des perspectives intéressantes pour le développement de stratégies thérapeutiques contre les pathologies neurodégénératives en exploitant directement les neurostéroïdes neuroprotecteurs ou en utilisant des agents pharmacologiques capables de stimuler la production endogène de ces neurostéroïdes dans le système nerveux.

## ABSTRACT

Neurons and glial cells are able to synthesize bioactive steroids also called neurosteroids. Pharmacological investigations have recently suggested that neurosteroids may participate to the regulation of neurodegenerative processes. However, there is no evidence showing that the viability and protection of nerve cells against degeneration depend on their own ability to produce endogenous neurosteroids. Therefore, we made the hypothesis that, if neurosteroids are endogenous molecules that are crucial for nerve cell survival, their biosynthesis (neurosteroidogenesis) should normally be modified or disturbed by key factors which induce neurodegeneration. To check this hypothesis, we focused our attention on the effects exerted on neurosteroidogenesis by pro-degenerative factors involved in the etiology of two frequently observed disorders which are Alzheimer's disease and pathological or chronic neuropathic pain.

In our study related to cellular mechanisms involved in Alzheimer's disease, microscopic and proteomic analyses revealed that cell morphology was unchanged in stably transfected human neuroblastoma SH-SY5Y cells overexpressing native tau (hTau40), mutant tau P301L and wild-type amyloid precursor protein (APPwt) compared to controls. In contrast, the process of neurosteroid biosynthesis was completely dysregulated in SH-SY5Y cells overexpressing hTau40, mutant tau P301L and APPwt. Indeed, the combination of pulse-chase experiments with HPLC analysis and flow scintillation detection (Flo/One), made it possible to observe a stimulatory effect of hTau40 on progesterone, 17OH-progesterone, testosterone and 3 $\alpha$ -androstenediol neosynthesis from pregnenolone in neuroblastoma cells. Tau with the pathogenic mutation P301L was devoid of action on neurosteroidogenesis. Overexpression of APPwt exerted a neurosteroid-dependent regulatory effect. These results demonstrate that key pro-degenerative factors control neurosteroidogenesis in human neuroblastoma cells. The data suggest that the process of neurosteroid biosynthesis belongs to mechanisms activated by native hTau40 to stabilize the cytoskeleton and to protect nerve cells against degeneration. Therefore, P301L mutation of tau, which induces the loss of the stimulatory property of tau on neurosteroidogenesis, may facilitate neurodegeneration. High concentrations of amyloid- $\beta$  peptides (A $\beta$ ) induce plaques in Alzheimer's disease but several studies showed that physiological or nanomolar (nM) doses of A $\beta$  are neuroprotective. Therefore, we performed viability assays which revealed that nM doses of A $\beta_{1-42}$  and A $\beta_{25-35}$  are devoid of toxicity on SH-SY5Y cells while the concentration of 12  $\mu$ M produced a high percentage of cell death. Pulse-chase, HPLC and Flo/One analyses demonstrated that nM doses of A $\beta_{1-42}$  decreased progesterone but increased estradiol synthesis from pregnenolone in SH-SY5Y cells. Physiological doses of A $\beta_{25-35}$  also reduced progesterone neosynthesis but had no effect on estradiol production. At 12  $\mu$ M, both A $\beta_{1-42}$  and A $\beta_{25-35}$  inhibited progesterone formation but only A $\beta_{1-42}$  reduced estradiol biosynthesis in neuroblastoma cells. These results demonstrate the existence of a selective and amino-acid dependent action of nM doses of A $\beta$  on neurosteroidogenesis. The fact that, nM concentrations of A $\beta_{1-42}$  stimulate the neuroprotective neurosteroid estradiol biosynthesis which is inhibited by high A $\beta_{1-42}$  doses, may explain why A $\beta_{1-42}$ , according to its concentration, is able to exert either neurodegenerative or neuroprotective effects.

Our results also show that estradiol biosynthesis from pregnenolone is selectively decreased in SH-SY5Y cells 12h after exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress, a causal factor of several neurodegenerative diseases. Real-time RT-PCR analysis revealed a down-regulation of aromatase (estradiol-synthesizing enzyme) in neuroblastoma cells 12h after the oxidative stress onset. Pretreatment of SH-SY5Y cells with estradiol was protective against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death, suggesting that endogenous estradiol formation is pivotal for SH-SY5Y cell viability.

The rat experimental model of neuropathic pain generated by sciatic nerve chronic constriction (CCI) was used to observe that apoptosis (investigated with TUNEL assays) does not occur in the spinal cord up to 30 days after induction of the nerve constriction, although the CCI-rats exhibited a thermal hyperalgesia and a mechanical allodynia. In contrast, apoptosis was evidenced in a restricted population of satellite glial cells in ipsilateral dorsal root ganglia of CCI-rats. Pulse-chase, HPLC and Flo/One studies showed an increase of endogenous estradiol production in sensory neurons surrounded by apoptotic satellite glial cells. These results suggest that endogenous neurosteroids may participate in the control of neurodegenerative events in dorsal root ganglia.

Taken together, our investigations demonstrate that key degenerative factors involved in the etiology of Alzheimer's disease and chronic neuropathic pain selectively modify neurosteroid biosynthetic pathways. Endogenous production of neuroprotective neurosteroids appears as a pivotal mechanism required for nerve cell survival or protection against degeneration. Indeed, suppression or inhibition of this mechanism by pro-degenerative factors leads to cell death. Our results open interesting perspectives for the development of neuroprotective strategies based on the direct use of neuroprotective neurosteroids or on the characterization of novel pharmacological agents capable of stimulating neuroprotective neurosteroid production in the nervous system.

## ABREVIATIONS

**A $\beta$**  :  $\beta$ -amyloïde

**APP** : *Amyloid Peptide Precursor*

**Atg** : *Autophagy-related Gene*

**Bcl-2** : *B-Cell Leukemia/Lymphoma 2-like proteins*

**BSA** : *Bovine Serum Albumine*

**CCI** : *Chronic Constriction Injury*

**CTF** : *Carboxy Terminal Fragment*

**DBD** : *DNA Binding Domain*

**DCM** : *Dichlorométhane*

**DD** : *Death Domain*

**DED** : *Death Effector Domain*

**5 $\alpha$ -DHDOC** : *5 $\alpha$ -Dihydrodéoxycorticostérone*

**DHEA** : *Déhydroépiandrostérone*

**DHEAS** : *Sulfate de Déhydroépiandrostérone*

**5 $\alpha$ -DHP** : *5 $\alpha$ -Dihydroprogestérone*

**5 $\alpha$ -DHT** : *5 $\alpha$ -Dihydrotestostérone*

**3 $\alpha$ DIOL** : *3 $\alpha$ -Androstanediol*

**DMEM** : *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

**DO** : *Densité Optique*

**DOC** : *Déoxycorticostérone*

**DRG** : *Dorsal Root Ganglion*

**GAPDH** : *Glyceraldéhyde-3-Phosphate Deshydrogénase*

**GC** : *Gas Chromatography*

**GSK3** : *Glycogène Synthase Kinase 3*

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : *Peroxyde d'Hydrogène*

**HPLC** : *High Performance Liquid Chromatography*

**HRE** : *Hormon Response Element*

**3 $\beta$ -HSD** : *3 $\beta$ -Hydroxystéroïde Deshydrogénase*

**17 $\beta$ -HSD** : *17 $\beta$ -Hydroxystéroïde Deshydrogénase*

**3 $\alpha$ -HSOR** : *3 $\alpha$ -Hydroxystéroïde Oxydo-réductase*

**Hsp** : *Heat Shock Protein*

**HST : Hydroxystéroïde Sulfotransférase**

**IAP : *Inhibitors of Apoptosis***

**IASP : *International Association for the Study of Pain***

**INSEE : Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques**

**JNK : *Jun Amino-terminal Kinase***

**LBD : *Ligand Binding Domain***

**MS : *Mass Spectrometry***

**mTOR : *mammalian Target Of Rapamycin***

**MTT : 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide**

**17OHPROG : 17 $\alpha$ -Hydroxyprogestérone**

**OMS : Organisation Mondiale de la Santé**

**P450c17 : cytochrome P450c17 (ou 17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20 lyase)**

**P450scc : *cytochrome P450 side-chain-cleavage***

**PB : *Phosphate Buffer***

**PCR : *Polymerase Chain Reaction***

**PI3K : *Phosphatidylinositol 3-kinase***

**PKB : Protéine Kinase B**

**PR : Récepteur aux Progestines**

**PREG : Prénénolone**

**PREGS : Sulfate de Prénénolone**

**PROG : Progestérone**

**PS : Préséniline**

**MAP : *Microtubule Associated Protein***

**5 $\alpha$ R : 5 $\alpha$ -Réductase**

**RIA : *RadioImmunoAssay***

**RT : *Reverse Transcription***

**rt-PCR : *real time PCR***

**SGC : *Satellite Glial Cells***

**STZ : Streptozotocine**

**TdT : *Terminal deoxynucleotidyl Transferase***

**3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THDOC : 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -Tétrahydrodéoxycorticostérone**

**3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP : 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -Tétrahydroprogestérone**

**TNF : *Tumor Necrosis Factor***

**TUNEL : *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase mediated dUTP Nick End Labelling***

## TABLE DES ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX

Figure 1 : Mort cellulaire par nécrose.....	18
Figure 2 : L'hypothèse des calpaïnes et des cathepsines.....	19
Figure 3 : Condensation de la chromatine qui s'accroche le long de l'enveloppe nucléaire.....	21
Figure 4 : Comparaison des principales étapes de la nécrose et de l'apoptose.....	21
Figure 5 : Voie extrinsèque de l'apoptose.....	23
Figure 6 : Voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose.....	27
Figure 7 : Activation des caspases.....	29
Figure 8 : Schéma simplifié montrant la régulation des caspases par les différentes voies apoptotiques.....	30
Figure 9 : Morphologie d'une cellule en autophagie.....	32
Figure 10 : Schéma représentant le processus autophagique.....	34
Figure 11 : Localisation de la séquence du peptide $\beta$ -amyloïde dans la séquence de l'APP.....	37
Figure 12 : Clivage de l'APP.....	38
Figure 13 : Représentation schématique de la $\gamma$ -sécrétase.....	39
Figure 14 : Représentation schématique de l'activation de l'apoptose par le peptide $\beta$ -amyloïde.....	41
Figure 15 : Les différentes isoformes de la protéine tau.....	44
Figure 16 : Schéma de la liaison de la protéine tau aux microtubules.....	45
Figure 17 : Paires de filaments hélicoïdaux.....	46
Figure 18 : Dégénérescences neurofibrillaires.....	46
Figure 19 : Mutations de tau dans les démences fronto-temporales avec un syndrome parkinsonien lié au chromosome 17.....	48
Figure 20 : Mécanisme de toxicité de la protéine tau.....	50
Figure 21 : Voies de biosynthèse des neurostéroïdes.....	65
Figure 22 : Différents domaines des récepteurs nucléaires aux stéroïdes.....	66
Figure 23 : Représentation schématique du DBD.....	67
Figure 24 : Modèle d'activation transcriptionnelle par les récepteurs des stéroïdes.....	68
Figure 25 : Technique de Pulse-chase.....	87

Figure 26 : Mode d'action du SYBR Green I.....	90
Figure 27 : Extraction des ARN totaux des cellules SH-SY5Y.....	92
Figure 28 : Transcription inverse (RT) des ARN totaux en ADNc.....	94
Figure 29 : Photographie du Light Cycler permettant la réalisation de la PCR quantitative en temps réel ou rtPCR.....	95
Figure 30 : Photographie d'un nerf sciatique 10 jours après la ligature.....	98
Figure 31 : Photographie du dispositif expérimental permettant la mesure du seuil de sensibilité à la douleur thermique (test du Plantar).....	100
Figure 32 : Photographie du dispositif expérimental permettant la mesure du seuil de sensibilité à la douleur mécanique (Test des filaments de von Frey).....	101
Figure 33 : Principe du marquage TUNEL.....	103
Tableau 1 : Tableau récapitulatif des produits nécessaires à la transcription inverse.....	93



## **INTRODUCTION**

## **I. Neurodégénérescence et conséquences physiopathologiques**

### **I.1. Les processus neurodégénératifs**

#### **I.1.1. Définition**

Les processus neurodégénératifs désignent l'ensemble des mécanismes conduisant à la destruction complète d'une cellule nerveuse ou à la détérioration d'une de ses parties constitutives. Schweichel et Merker (1973) ont proposé une classification distinguant trois types de mort cellulaire qui sont actuellement connus sous les termes d'apoptose, nécrose et autophagie. A l'opposé de la nécrose, l'apoptose et l'autophagie sont des morts cellulaires programmées dont l'exécution est sous contrôle génétique et se réalise selon un plan bien déterminé. Ces trois types de mort cellulaire se distinguent par les modifications morphologiques qu'ils entraînent ainsi que par les mécanismes mis en jeu.

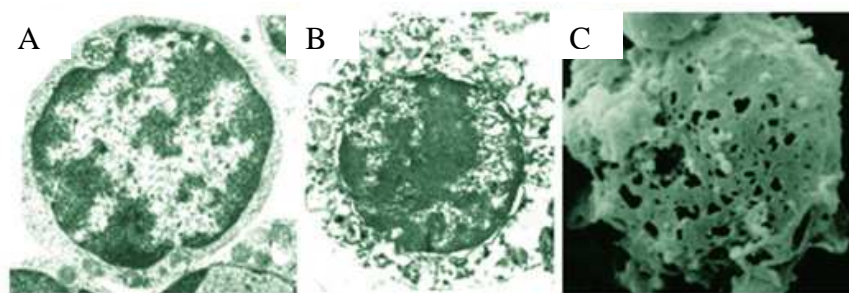
#### **I.1.2. Nécrose**

La nécrose est considérée comme une mort cellulaire « désordonnée » qui apparaît comme la conséquence d'une impossibilité à rétablir un équilibre compatible avec le maintien des fonctions biologiques de la cellule. La nécrose commence lorsque les conditions environnementales sont mauvaises, par exemple lors d'un déficit en oxygène, en nutriments essentiels ou en énergie (Leist et coll. 1997). La nécrose survient aussi quand les cellules sont exposées à des températures excessivement chaudes ou froides, à des molécules toxiques comme de fortes concentrations de détergents, d'oxydants, d'acides ou de glutamate

(Ankarcrona et coll. 1995 ; Ding et coll. 2000). Enfin, des lésions physiques telles que des traumatismes peuvent également conduire à la nécrose (Martin et coll. 1998 ; Martin 2001).

#### **I.1.2.1. Caractéristiques morphologiques de la nécrose**

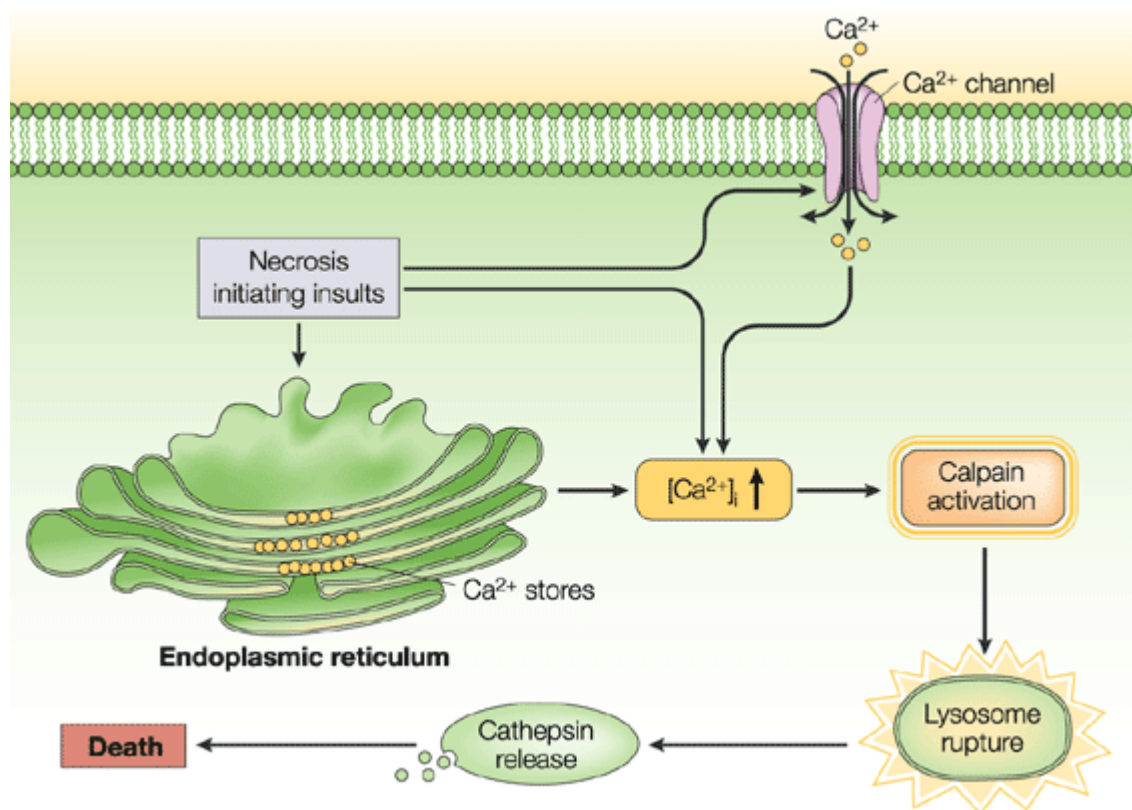
La cellule en nécrose perd le contrôle de sa balance ionique et se gorge d'eau. On observe tout d'abord un gonflement des organites cytoplasmiques, notamment de la mitochondrie et du réticulum endoplasmique, puis toute la cellule se dilate. Des vacuoles se forment dans le cytoplasme et les membranes cytoplasmique et nucléaire se fragmentent (Clarke 1990). L'ADN nucléaire est dégradé de façon aléatoire par des endonucléases activées notamment par des protéases à sérine (Bicknell et Cohen 1995 ; Dong et coll. 1997). La dernière étape de la mort cellulaire par nécrose est la lyse de la membrane plasmique (**Figures 1 et 4**) qui conduit à la libération, dans le milieu environnant, de cytokines pro-inflammatoires qui déclenchent une inflammation du tissu avoisinant le site nécrotique (Ziegler et Groscurth 2004 ; Vanden Berghe et coll. 2006).



**Figure 1 : Mort cellulaire par nécrose.** Photographies de microscopie électronique d'une cellule normale (A) et d'une cellule nécrotique (B). La dernière étape de la nécrose est la lyse de la membrane plasmique (C). Syntichaki et Tavernarakis 2003.

### I.1.2.2. Mécanismes nécrotiques

L'hypothèse majeure expliquant les mécanismes nécrotiques fait intervenir deux médiateurs principaux : les calpaïnes et les cathepsines (**Figure 2**). Les calpaïnes sont des protéases à cystéines activées par le calcium et les cathepsines sont des protéases lysosomales à aspartyl ou à cystéine. Après un stimulus nécrotique, l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium induite active les calpaïnes qui hydrolysent la fodrine, une protéine impliquée dans la déstabilisation du cytosquelette d'actine (Yamakawa et coll. 2001). Les calpaïnes compromettent également l'intégrité de la membrane lysosomale conduisant à la libération des cathepsines qui dégradent de nombreux constituants cellulaires essentiels entraînant ainsi la mort cellulaire (Syntichaki et Tavernarakis 2003).



**Figure 2 : L'hypothèse des calpaïnes et des cathepsines.**

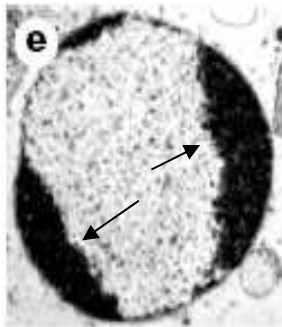
*Syntichaki et Tavernarakis 2003.*

### I.1.3. Apoptose

Le terme apoptose dérive du mot grec «*apoptosis*» désignant un processus naturel programmé, la chute des feuilles à l'automne. L'apoptose est un mécanisme actif qui requiert de l'énergie. C'est un processus génétiquement programmé, bien ordonné et caractérisé par des changements morphologiques stéréotypés bien visibles, notamment dans le noyau cellulaire. Kerr et collaborateurs (1972) ont été les premiers à décrire les événements morphologiques caractéristiques de l'apoptose et à différencier ce processus de la nécrose.

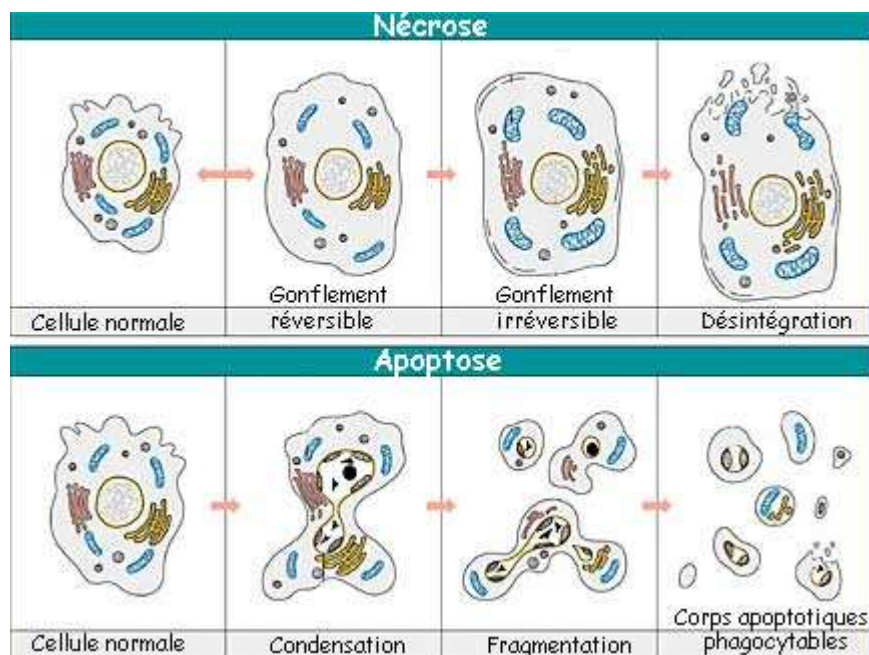
#### I.1.3.1. Caractéristiques morphologiques de l'apoptose

Une cellule en apoptose active une série d'évènements moléculaires conduisant à des altérations morphologiques spécifiques. Dans un premier temps, on observe une perte d'adhérence de la cellule entrant en apoptose vis-à-vis des cellules voisines et de la matrice extracellulaire. Contrairement à la nécrose, l'intégrité de la membrane et des organites est préservée au cours de l'apoptose. Le volume du noyau diminue car la chromatine se condense et s'agglutine sur les bords de la membrane nucléaire avant de se fragmenter en oligonucléotides de 180 à 200 paires de base (Wyllie 1980) (**Figure 3**). La fragmentation internucléosomale de l'ADN est due à l'activation d'endonucléases calcium dépendantes telles que l'endonucléase CAD/DFF40 et la DNase II (Ferri et Kroemer 2000). Enfin, il y a formation de corps apoptotiques (**Figure 4**) qui sont ensuite phagocytés par les macrophages ou les cellules voisines capables de reconnaître les cellules en apoptose grâce aux signaux tels que les phosphatidylsérines exposées sur leur surface extracellulaire (Savill 1998). La phagocytose des corps apoptotiques empêche la survenue de processus inflammatoires.



**Figure 3 : Condensation de la chromatine qui s'accrole le long de l'enveloppe nucléaire (flèche).**

*Leist et Jäättelä 2001.*



**Figure 4 : Comparaison des principales étapes de la nécrose et de l'apoptose.**

*La nécrose se caractérise par le gonflement de la cellule jusqu'à son éclatement alors que l'apoptose se définit par une diminution du volume de la cellule et du noyau, une fragmentation de la chromatine et la formation de corps apoptotiques.*

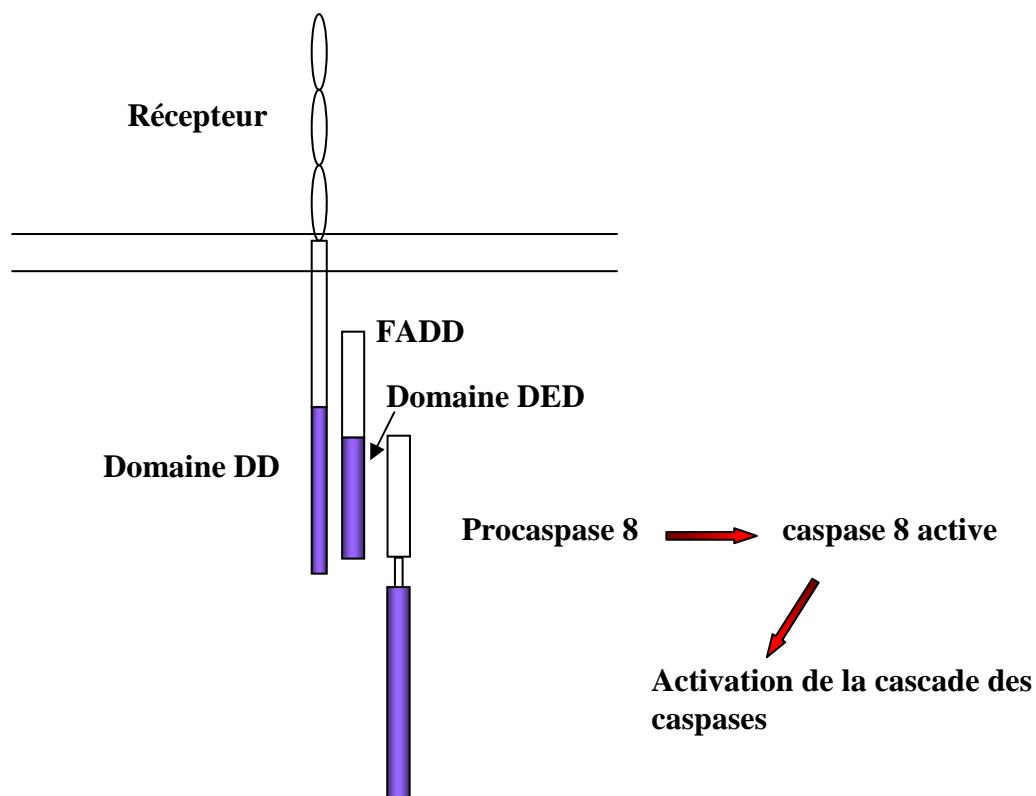
*Figure tirée du site internet <http://lecerveau.mcgill.ca>*

### I.1.3.2. Voies apoptotiques

Divers facteurs peuvent conduire au déclenchement des processus apoptotiques. Il existe deux principales voies de signalisation de l'apoptose : une voie extrinsèque faisant intervenir les récepteurs à domaine de mort (DD : *death domain*) et une voie intrinsèque impliquant la mitochondrie.

#### I.1.3.2.1. Voie apoptotique extrinsèque

Les ligands activant les récepteurs DD font partie de la famille du TNF (*tumor necrosis factor*). Quelques exemples sont le TNF $\alpha$ , le FasL/CD95L, le TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*, encore appelé Apo2L) et le TWEAK/Apo3L (Chicheportiche et coll. 1997 ; Marsters et coll. 1998). Ces ligands s'associent sous forme de trimère avant d'activer les récepteurs de type 1 ou 2 du TNF ou d'autres récepteurs appartenant à la même famille, notamment le récepteur Fas (appelé aussi CD95 ou Apo-1) ou les récepteurs TRAIL (Nagata et Golstein 1995 ; Ashkenazi et Dixit 1999). Tous ces récepteurs DD sont caractérisés par un motif N-terminal extracellulaire riche en cystéines et un domaine de mort intracellulaire. La fixation des ligands sur ces récepteurs conduit au recrutement d'une protéine adaptatrice telle que la protéine FADD (*Fas associated death domain*) qui possède un domaine effecteur de mort (DED : *death effector domain*). Le DED permet de déclencher la cascade des caspases en recrutant les caspases 8 et 10 qui elles-mêmes activent les caspases 3, 6 et 7 (Tanaka et coll. 1995 ; Longthorne et Williams 1997 ; Ashkenazi et Dixit 1998) (Figures 5 et 6).



**Figure 5 : Voie extrinsèque de l'apoptose.**

*Adaptée de Wu et coll. 2001.*

L'existence d'une voie alternative a également été suggérée pour le récepteur Fas. Dans cette voie, Fas recrute la protéine nucléaire Daxx qui permet l'activation de ASK1 (*apoptosis-stimulating kinase 1*) puis de JNK1 (*jun amino-terminal kinase 1*) et de facteurs nucléaires tels que c-Jun (Yang et coll. 1997b ; Chang et coll. 1998). La phosphorylation de c-Jun conduit à l'expression de gènes pro-apoptotiques, notamment le gène codant le  $\text{TNF}\alpha$  (Verheij et coll. 1996 ; Mielke et Herdegen 2000).



### I.1.3.2.2. Voie apoptotique intrinsèque

La voie intrinsèque se déclenche au niveau mitochondrial par divers stimuli tels que les radiations UV, la déprivation de facteurs de croissance, l'hypoxie ou encore certaines substances cytotoxiques. La mitochondrie joue un rôle vital dans la cellule en assurant diverses fonctions essentielles telles que la production d'énergie, l'homéostasie calcique, le maintien du potentiel d'oxydo-réduction. Ainsi, une perturbation des fonctions mitochondriales peut être à l'origine de la mort cellulaire.

L'activation de la voie apoptotique entraîne un changement de la perméabilité de la membrane mitochondriale externe et un blocage de la chaîne respiratoire conduisant à la perturbation du potentiel membranaire ainsi qu'à un déficit en ATP (Green et Reed 1998). On observe également une libération dans le cytoplasme de protéines comme le cytochrome c localisées dans l'espace inter-membranaire mitochondrial. Le cytochrome c se lie à la molécule adaptatrice Apaf-1 (*Apoptotic protease-activating factor-1*) qui change de conformation par un mécanisme ATP dépendant (Hu et coll. 1999 ; Purring-Koch et McLendon 2000). Puis, sept sous-unités Apaf-1 s'oligomérisent et recrutent plusieurs procaspases 9 formant ainsi l'apoptosome qui active la cascade des caspases (Srinivasula et coll. 1998 ; Saleh et coll. 1999 ; Acehan et coll. 2002) (**Figure 6**).

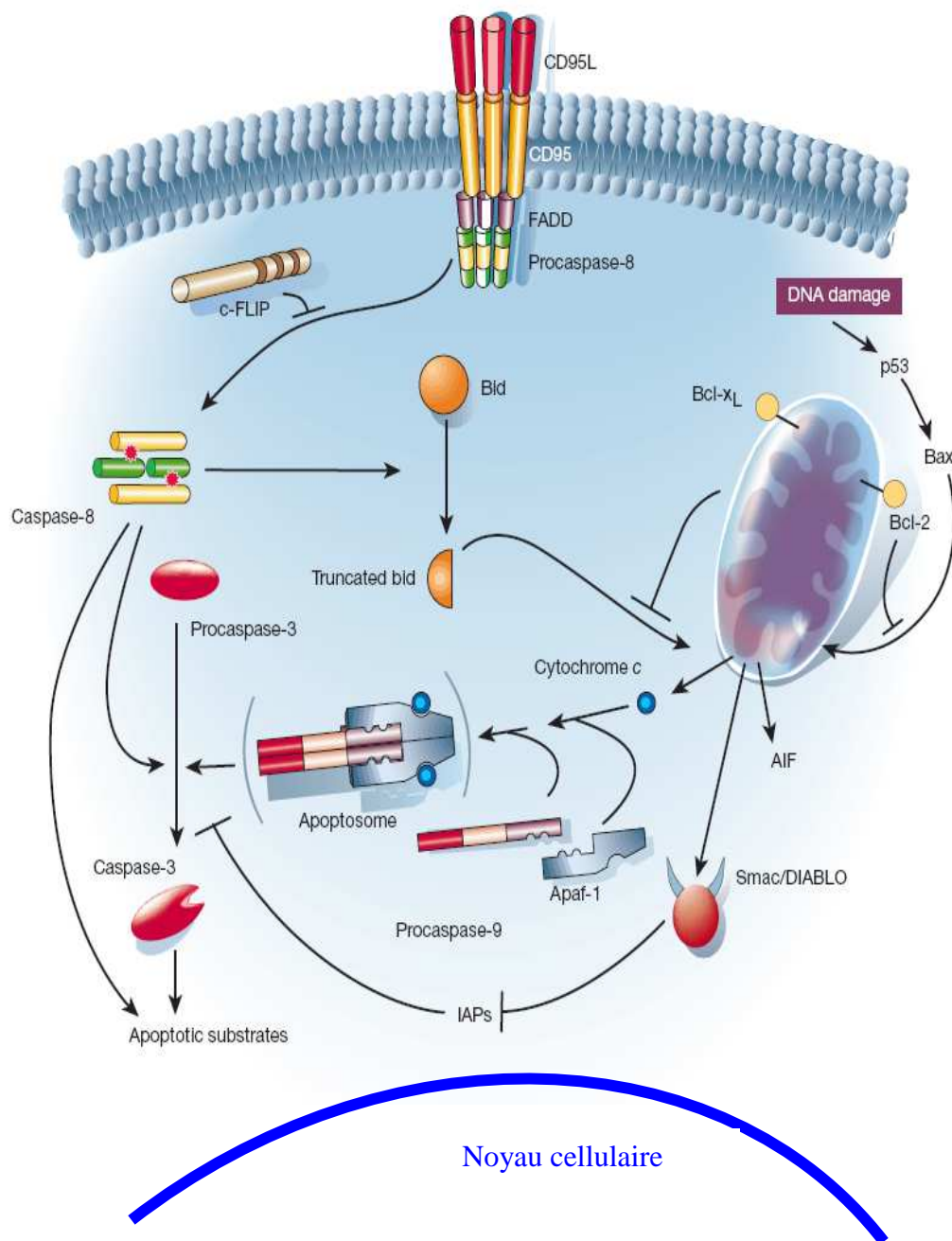
En plus du cytochrome c d'autres protéines mitochondriales telles que l'HtrA2/Omi et le Smac (*second mitochondria-derived activator of caspase*)/DIABLO (*direct IAP binding with low pI*) sont impliquées dans l'activation de l'apoptose. L'HtrA2/Omi et le Smac/DIABLO bloquent les inhibiteurs de caspases (IAP) (Du et coll. 2000 ; Verhagen et coll. 2000 ; Ravagnan et coll. 2002 ; Adams 2003).

Enfin, des facteurs pro-apoptotiques tels que les AIF (*apoptosis inducing factors*) et l'endonucléase G, qui sont libérés de la mitochondrie, induisent dans le noyau la condensation

de la chromatine et la fragmentation de l'ADN (Lorenzo et coll. 1999 ; Susin et coll. 1999 ; Li et coll. 2001b).

La voie apoptotique intrinsèque est régulée par les protéines de la famille des proto-oncogènes Bcl-2 (*B-cell leukemia/lymphoma 2-like proteins*) (Kuwana et Newmeyer 2003). Ces protéines sont constituées d'un domaine C-terminal hydrophobe transmembranaire permettant leur ancrage dans les membranes notamment la membrane externe de la mitochondrie (Petros et coll. 2004). De plus, les protéines Bcl-2 ont des domaines très conservés appelés domaines BH (*Bcl-2 homology*). Par exemple, le domaine BH3 intervient dans le contrôle de l'apoptose et de la dimérisation des protéines de la famille Bcl-2 (Gross et coll. 1999). Certains membres de la famille Bcl-2 tels que les protéines Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub> sont des protéines anti-apoptotiques et inhibent l'apoptose en empêchant la libération du contenu mitochondrial dans le cytoplasme. D'autres membres de la famille Bcl-2 (Bid, Bik, Bim, Bax, Bcl-x<sub>S</sub>, Bak, Bad) ont une activité pro-apoptotique en favorisant la libération des protéines de l'espace inter-membranaire mitochondrial (Reed et coll. 1998 ; Newmeyer et Ferguson-Miller 2003). La régulation de l'apoptose dépend du niveau d'expression des protéines pro- et anti-apoptotiques. En effet, les protéines Bcl-2 pro-apoptotiques se lient aux protéines anti-apoptotiques et neutralisent ainsi leur fonction de survie. Les cellules exprimant plus de protéines pro-apoptotiques seront donc plus sensibles à la mort (Hengartner 2000). Il a été suggéré que les protéines de la famille Bcl-2 s'insèrent dans la membrane mitochondriale et forment un canal en s'oligomérisant (Schlesinger et coll. 1997). Le canal formé par les formes pro-apoptotiques conduirait à la libération des protéines mitochondriales impliquées dans l'apoptose (Kluck et coll. 1997 ; Yang et coll. 1997a). Une autre hypothèse indique que la perméabilité membranaire serait liée à la formation de petits canaux dans la membrane permettant l'entrée d'eau dans la mitochondrie et la libération des protéines mitochondriales. Ce phénomène de perméabilité transitoire de la mitochondrie (*Mitochondrial Permeability*

*Transition*, MPT) semble toutefois contesté depuis qu'il a été montré que la voie apoptotique intrinsèque ne dépend pas des protéines impliquées dans le MPT (Green 2005). Enfin, d'autres auteurs ont proposé la formation d'un canal chimérique constitué des protéines Bcl-2 pro-apoptotiques et du canal anionique voltage dépendant VDAC (*Voltage-Dependent Anion Channel*) pour permettre la fuite des protéines mitochondriales dans le cytoplasme (Hengartner 2000 ; Polster et Fiskum 2004 ; Sharpe et coll. 2004).



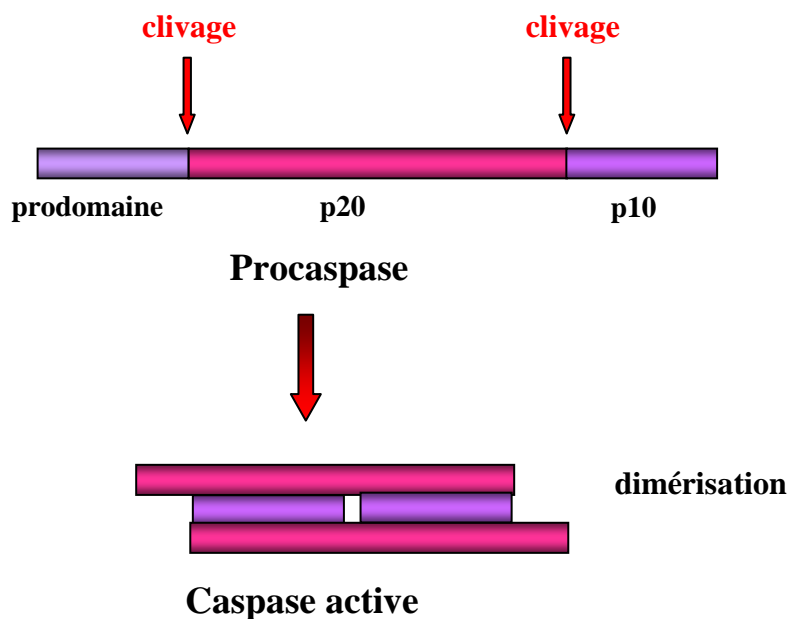
**Figure 6 : Voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose.**

Dans la voie extrinsèque, l'apoptose est déclenchée par l'activation de récepteurs à domaine de mort qui recrutent FADD et activent les caspases. Dans la voie intrinsèque, il y a libération de protéines mitochondriales dont le cytochrome c et Smac/DIABLO. Le cytochrome c associé à Apaf-1 et la procaspase 9 forment l'apoptosome qui déclenche la cascade des caspases.

Hengartner 2000.

### I.1.3.3. Les caspases

Les caspases (Alnemri et coll. 1996) sont des protéases dont le site actif contient une cystéine. Elles clivent spécifiquement les protéines au niveau de sites consensus après un résidu aspartate (Thornberry et coll. 1997 ; Nicholson 1999). Les caspases jouent un rôle primordial dans l'exécution de l'apoptose en étant les éléments centraux des différentes voies de signalisation impliquées et les facteurs responsables des modifications morphologiques observées (Earnshaw et coll. 1999). Elles sont activées par les récepteurs DD et par les molécules pro-apoptotiques libérées à partir de la mitochondrie. Les caspases ont une structure très conservée et sont présentes dans la cellule sous une forme inactive ou procaspase constituée d'un prodomaine, d'une grande sous-unité de 20 kDa (p20) et d'une petite sous-unité de 10 kDa (p10). Certaines procaspases présentent en plus un domaine de liaison entre la grande et la petite sous-unité (Thornberry 1998). Lors de leur activation, les procaspases sont clivées au niveau de deux sites consensus, ce qui conduit à la séparation du prodomaine et des deux sous-unités. La grande sous-unité contient le domaine catalytique mais celui-ci n'est actif que s'il est lié à la petite sous-unité. De plus, l'activité caspase nécessite la formation de dimères (Wilson et coll. 1994) (**Figure 7**). Les caspases peuvent activer d'autres caspases formant ainsi la cascade des caspases observée dans les différentes voies de signalisation pro-apoptotiques (Thornberry 1998 ; Thornberry et Lazebnik 1998 ; Hengartner 2000).



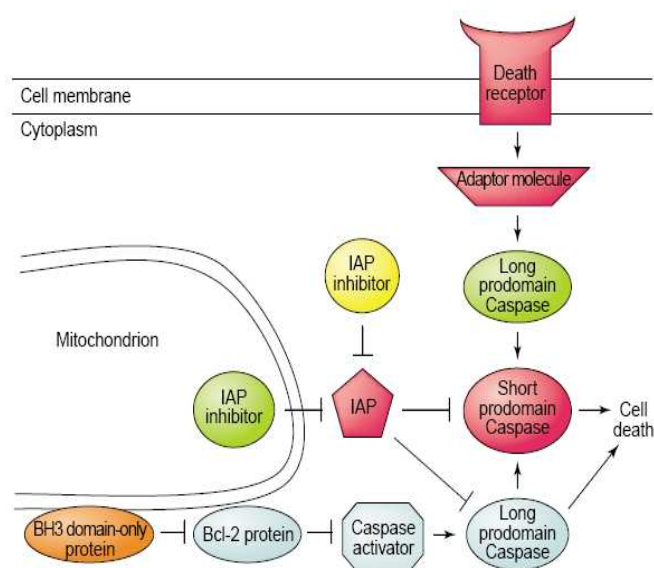
**Figure 7 : Activation des caspases.**

*Les procaspases sont constituées d'un prodomaine, d'une grande sous-unité (p20) et d'une petite sous-unité (p10). Les caspases sont actives sous la forme d'un dimère constitué de la grande et de la petite sous-unité.*

Parmi la famille des caspases impliquées dans l'apoptose, on distingue les caspases régulatrices des caspases exécutrices. Les caspases régulatrices ou initiatrices présentent un prodomaine long et leur activation permet le recrutement des caspases exécutrices dans la cascade des caspases (**Figure 8**). Les caspases 8, 9 et 10 constituent les caspases régulatrices, les caspases 8 et 10 étant activées par la voie extrinsèque alors que la caspase 9 est impliquée dans la voie mitochondriale (Krammer 2000 ; Gupta 2003).

Les caspases exécutrices sont les caspases à prodomaines courts : caspases 3, 6, 7 et 14. Ces caspases sont directement impliquées dans l'exécution de la mort cellulaire et leur activation constitue le point de non retour de l'apoptose. Les caspases exécutrices ont différents substrats dans la cellule et sont à l'origine des particularités biochimiques et morphologiques des cellules apoptotiques (Earnshaw et coll. 1999 ; Nicholson 1999 ; Yuan et

Yankner 2000). Elles inactivent les inhibiteurs de l'apoptose, endommagent les protéines du cytosquelette telles que la fodrine, la gelsoline (Kothakota et coll. 1997), les protéines nucléaires telles que les lamines (Rao et coll. 1996 ; Buendia et coll. 1999) et les éléments de réparation cellulaire tels que la *poly ADP-ribose polymérase* ou PARP (Soldani et Scovassi 2002). Parmi les nombreux substrats des caspases, on peut citer par exemple les endonucléases responsables de la fragmentation internucléosomale de l'ADN (Liu et coll. 1997 ; Enari et coll. 1998 ; Sakahira et coll. 1998 ; Samejima et coll. 2001). Les caspases peuvent également cliver des protéines de la famille Bcl-2 et ainsi activer la voie apoptotique intrinsèque (Li et coll. 1998 ; Luo et coll. 1998) (**Figure 6**). Chez les mammifères, des inhibiteurs endogènes de caspase ont été identifiés et dénommés les IAP ou *inhibitors of apoptosis* (Deveraux et coll. 1997 ; Deveraux et Reed 1999 ; Miller 1999). La famille des protéines IAP est caractérisée par la présence d'un ou de deux domaines répétés BIR (*baculovirus IAP repeat*) qui sont impliqués dans l'inhibition des caspases (Deveraux et Reed 1999 ; Fesik et Shi 2001) (**Figure 8**). Les IAP sont contrôlés par les protéines Smac/DIABLO et HtrA2/Omi qui sont libérées de la mitochondrie lors de l'apoptose (Du et coll. 2000 ; Liston et coll. 2003).



**Figure 8 : Schéma simplifié montrant la régulation des caspases par les différentes voies apoptotiques.**

Abraham et Shaham 2004.

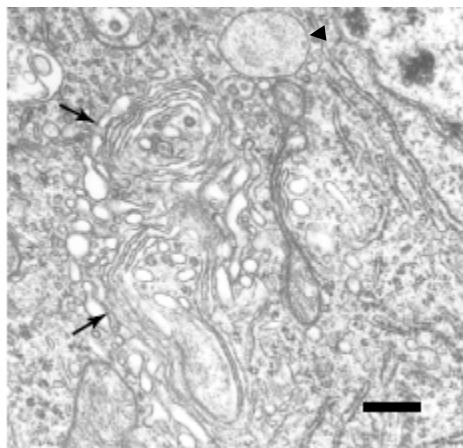
#### **I.1.4. Autophagie**

La mort cellulaire lysosomale encore appelée autophagie ou macro-autophagie est une mort cellulaire programmée dont le mécanisme est très conservé au cours de l'évolution. Le terme autophagie dérive des mots grecs « *autos* » et « *phagein* » qui signifient se manger soi-même. L'autophagie a un rôle de dégradation des organelles endommagées et des protéines vieillissantes. En plus de ce rôle catabolique, l'autophagie permet de produire de l'énergie. Dans un but stratégique, les constituants cellulaires sont dégradés pour produire de l'énergie permettant d'assurer la survie de la cellule lors d'un déficit en nutriments. Ainsi, l'autophagie est un mécanisme de défense qui permet temporairement la survie de la cellule (Lum et coll. 2005). Toutefois, dans des conditions de stress cellulaire qui n'induisent pas de déficit énergétique telles que l'exposition à certaines substances cytotoxiques et dans les cas où le déficit énergétique ne peut pas être compensé par la cellule, l'autophagie devient un processus dégénératif (Shintani et Klionsky 2004 ; Baehrecke 2005 ; Tsujimoto et Shimizu 2005).

##### **I.1.4.1. Caractéristiques morphologiques de l'autophagie**

Au cours de l'autophagie, des vésicules à double membrane se forment dans le cytoplasme des cellules et encapsulent des constituants cellulaires notamment les organites (Klionsky et Emr 2000). Ces vésicules, appelées autophagosomes, fusionnent avec les lysosomes pour former des autolysosomes au sein desquels le contenu vésiculaire est dégradé par les hydrolases lysosomales (Lee et Baehrecke 2001) (**Figure 9**). Lorsqu'environ 80% du cytoplasme est digéré, on observe une condensation du cytoplasme et de l'ADN. Finalement, tout comme dans l'apoptose, les cellules sont phagocytées.





**Figure 9 : Morphologie d'une cellule en autophagie.**  
 Lors de l'autophagie il y a formation de vésicules, les autophagosomes (flèches), qui vont fusionner avec le lysosome (tête de flèche).  
 Abraham et Shaham 2004.

#### I.1.4.2. Mécanismes moléculaires régulant l'autophagie

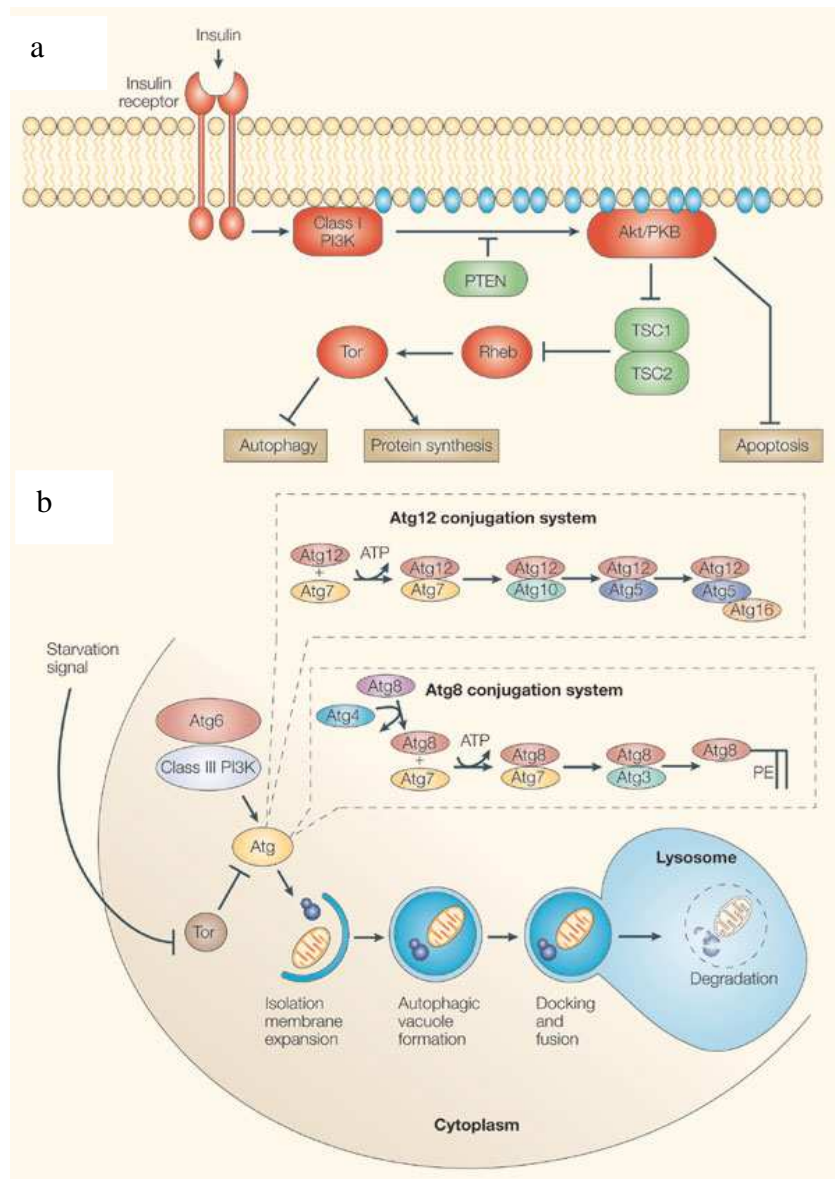
Des études chez la levure ont permis d'identifier les *Autophagy-related genes* (Atg) codant des protéines responsables du contrôle de l'autophagie (Tsukada et Ohsumi 1993 ; Thumm et coll. 1994 ; Harding et coll. 1995). Outre la levure, les Atg sont exprimés dans les cellules de nombreuses espèces animales y compris les mammifères. Les protéines Atg sont sous le contrôle des phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K) de type I et III intervenant dans l'inhibition ou l'activation de l'autophagie (Petiot et coll. 2000). En effet, lorsque le milieu environnant contient les éléments nutritifs permettant la survie cellulaire une voie inhibant la mise en place de l'autophagie est activée par les facteurs de croissance. Les récepteurs des facteurs de croissance recruterait la PI3K de type I qui contrôle la protéine kinase B (Akt/PKB). L'activation de la Akt/PKB conduirait à la répression des protéines stimulatrices de l'autophagie telles que le *Tuberous Sclerosis Complex* 1 et 2 (TSC1 et TSC2) et la protéine G Rheb (**Figure 10a**). L'ensemble de ces mécanismes régulerait la protéine *mammalian target of rapamycin* ou mTOR qui inhiberait l'activation de l'autophagie en phosphorylant Atg13 qui ne peut alors pas se lier à Atg1. En condition de déficits en nutriments, la protéine Atg13 est déphosphorylée et forme avec Atg1 une sérine/thréonine kinase dont l'activité

semble nécessaire pour la mise en place de l'autophagie (pour revue, Yorimitsu et Klionsky 2005).

L'activation de l'autophagie, et en particulier la formation des autophagosomes, dépend de la PI3K de type III, constituée notamment d'Atg6, qui active deux mécanismes similaires au système d'ubiquitylation : la voie Atg12 et la voie Atg8.

La protéine Atg12 se lie à l'Atg7 par un mécanisme ATP dépendant. L'hydrolyse de l'ATP permet l'activation d'Atg12 qui est transférée successivement à l'Atg10 puis à l'Atg5 avec laquelle elle forme un complexe protéique stabilisé par l'Atg16. Ce complexe Atg16/Atg12/Atg5 se lie à la membrane et permet la formation de l'autophagosome, en particulier l'extension de la membrane encapsulant les constituants cellulaires (pour revue, Yorimitsu et Klionsky 2005) (**Figure 10b**).

La protéine Atg8 est clivée par l'Atg4 qui présente une activité cystéine protéase. Après s'être liée à Atg7 et Atg3, la protéine Atg8 est directement conjuguée aux phosphatidylethanolamines insérées dans la membrane qui forme l'autophagosome. La voie de l'Atg8 semble être impliquée dans le contrôle de la taille des autophagosomes (Tsujimoto et Shimizu 2005 ; Yorimitsu et Klionsky 2005) (**Figure 10b**).



**Figure 10 : Schéma représentant le processus autophagique.**

(a) La PI3KI inhibe l'autophagie via Akt/PKB et mTOR. (b) La PI3KIII est impliquée dans la formation des vésicules autophagiques qui font intervenir deux voies, la voie Atg12 et la voie Atg8. Baehrecke 2005.

## **I.2. Conséquences physiopathologiques**

La mort cellulaire programmée intervient dans de nombreux processus biologiques et joue un véritable rôle physiologique. Elle permet d'éliminer les cellules surnuméraires au cours du développement et les cellules pathologiques ou sénescents chez l'adulte. Toutefois, le dérèglement des processus de mort cellulaire conduit à de nombreuses pathologies. Par exemple, l'inhibition de l'apoptose ou de l'autophagie semble favoriser le développement de tumeurs (Kisen et coll. 1993 ; Liang et coll. 1999 ; Hanahan et Weinberg 2000 ; Hickman 2002 ; Johnstone et coll. 2002 ; Qu et coll. 2003). En revanche, de nombreuses maladies neurodégénératives sont associées à un excès d'apoptose (Thompson 1995) ou encore d'autophagie (Anglade et coll. 1997 ; Bursch 2001 ; Bahr et Bendiske 2002 ; Shintani et Klionsky 2004). En effet, les neurones sont des cellules post-mitotiques qui assurent leur fonction pendant toute la vie de l'individu. Ainsi, lorsqu'une mort neuronale excessive a lieu la totalité des neurones perdus n'est pas remplacée, ce qui conduit à des pathologies aux conséquences dramatiques.

Actuellement, l'implication de l'apoptose dans l'étiologie des maladies neurodégénératives semble clairement établie. En effet, de nombreuses neuropathologies sont associées à un excès d'apoptose dans certaines régions du système nerveux central conduisant à des symptômes variables selon les régions touchées (Mattson 2000). Par exemple, la maladie de Parkinson est associée à une dégénérescence des neurones dopaminergiques de la *pars compacta* de la substance noire (Anglade et coll. 1997 ; Viswanath et coll. 2001). La maladie de Huntington est caractérisée par une mort neuronale dans le striatum et le cortex cérébral (Sanchez et coll. 1999). On peut également citer la sclérose latérale amyotrophique provoquée par une perte des motoneurones (Friedlander et coll. 1997 ; Pasinelli et coll. 1998), la maladie d'Alzheimer caractérisée par une dégénérescence des neurones hippocampiques, corticaux et sous-corticaux (Chan et coll. 1999b ; LeBlanc et coll. 1999 ; Stadelmann et coll.

1999) et enfin les douleurs neuropathiques résultant d'une lésion du système nerveux ou d'une mort neuronale dans les cornes dorsales de la moelle épinière (Whiteside et Munglani 2001 ; Maione et coll. 2002).

La maladie d'Alzheimer et les douleurs chroniques neuropathiques sont de véritables problèmes de santé publique avec des conséquences graves sur la vie quotidienne des patients et de leur entourage. Il est donc urgent pour la recherche biomédicale de trouver des solutions pour élaborer des stratégies thérapeutiques efficaces contre les processus neurodégénératifs conduisant à la maladie d'Alzheimer et aux douleurs chroniques neuropathiques.

## **II. Maladie d'Alzheimer**

La maladie d'Alzheimer constitue la forme de démence la plus fréquente chez les personnes âgées puisque 25 millions de personnes dans le monde souffrent de cette pathologie. Le principal facteur de risque de la maladie d'Alzheimer est l'âge. En effet, la pathologie touche 5% des plus de 65 ans et 25% des plus de 80 ans. Le constat est d'autant plus alarmant que, d'après les prévisions de l'Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques (INSEE) et du fait du vieillissement de la population, 1,3 million de personnes seront atteintes de la maladie d'Alzheimer en France en 2020, ce qui représente plus d'une personne de plus de 65 ans sur quatre.

Sur le plan clinique, les patients atteints de la maladie d'Alzheimer souffrent de déficits cognitifs et mnésiques, de troubles de l'humeur, du jugement et du langage. La maladie d'Alzheimer se caractérise d'un point de vue physiopathologique par une neurodégénérescence dans l'hippocampe, les cortex entorhinal, frontal, pariétal et temporal ainsi que dans certains noyaux sous-corticaux (West et coll. 1994). Le cerveau des patients atteints de maladie d'Alzheimer présente deux types de lésions caractéristiques : (i) les

plaques amyloïdes qui sont des dépôts extracellulaires d'un peptide de 40 à 42 acides aminés, le peptide  $\beta$ -amyloïde (Glenner et Wong 1984 ; Masters et coll. 1985 ; Selkoe et coll. 1986 ; Joachim et coll. 1988 ; Miller et coll. 1993) ; (ii) les dégénérescences neurofibrillaires qui sont des agrégats intracellulaires de protéine tau hyperphosphorylée (Grundke-Iqbal et coll. 1986b ; Kosik et coll. 1986 ; Goedert et coll. 1988).

## II.1. Le peptide $\beta$ -amyloïde

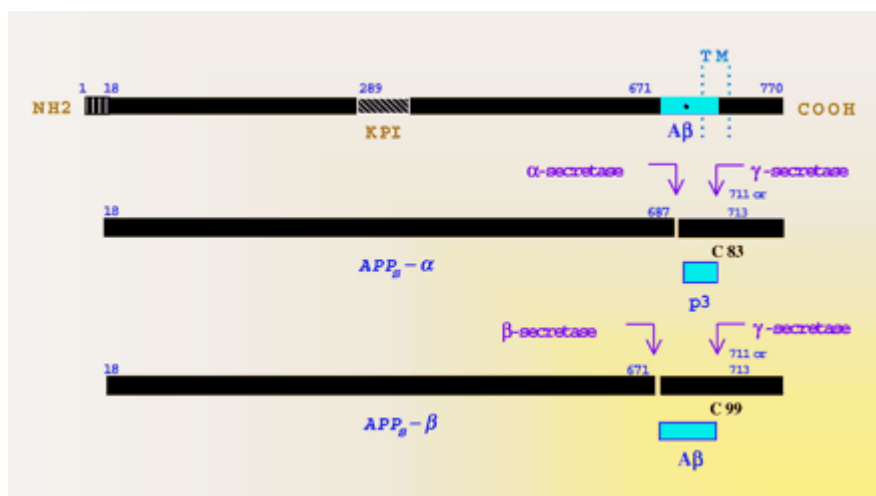
### II.1.1. Présentation

Le peptide  $\beta$ -amyloïde ( $A\beta$ ) est un petit peptide d'environ 4 kDa produit par le clivage successif de l'*amyloid peptide precursor* ou APP qui est un précurseur de haut poids moléculaire (110-130 kDa). L'APP est une protéine transmembranaire ubiquitaire présentant une longue partie N-terminale extracellulaire et une courte extrémité C-terminale cytoplasmique (Kang et coll. 1987 ; Robakis et coll. 1987 ; Jung et coll. 1996). L' $A\beta$  correspond aux acides aminés 597 à 639 de l'APP (**Figure 11**).



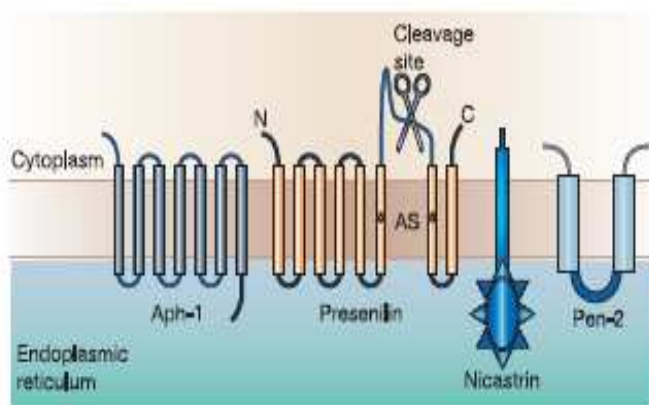
**Figure 11 : Localisation de la séquence du peptide  $\beta$ -amyloïde dans la séquence de l'APP.**

L'APP est naturellement clivé selon deux mécanismes distincts : une voie faisant intervenir l' $\alpha$ -secrétase et la  $\gamma$ -secrétase et une autre impliquant la  $\beta$ -secrétase et la  $\gamma$ -secrétase. L' $\alpha$ -secrétase clive l'APP entre les acides aminés 612 et 613 et la  $\beta$ -secrétase entre les acides aminés 596 et 597, ce qui conduit à l'excrétion d'une forme soluble d'APP ( $\alpha$ APP et  $\beta$ APP respectivement) et à la formation d'un fragment C-terminal transmembranaire ( $\alpha$ CTF ou C83 et  $\beta$ CTF ou C99) (**Figure 12**). Le fragment C-terminal est endocyté et clivé par la  $\gamma$ -secrétase entre les acides aminés 639 et 640. Le clivage successif de l'APP par l' $\alpha$ - et la  $\gamma$ -secrétase conduit à la formation de  $\alpha$ APP et de deux petits peptides p3 et C59. En revanche, le clivage de l'APP par la  $\beta$ - et la  $\gamma$ -secrétase entraîne la production de  $\beta$ APP, de C59 et de peptide  $\beta$ -amyloïde (Mattson 1997 ; Selkoe 2001 ; Haass 2004) (**Figure 12**).



**Figure 12 : Clivage de l'APP.** L'activité protéolytique de l' $\alpha$ - et de la  $\gamma$ -secrétase permet de cliver l'APP en  $\alpha$ APP soluble, p3, C59. L'APP peut également être clivé par la  $\beta$ - et la  $\gamma$ -secrétase conduisant à la formation de  $\beta$ APP soluble, C59 et A $\beta$ .  
Selkoe 2001.

La  $\beta$ -secrétase, encore appelée BACE, est une aspartyl protéase liée à la membrane présente dans tous les tissus et existant en deux isoformes, BACE1 (exprimée fortement dans le système nerveux central) et BACE2 (peu exprimée dans le système nerveux) (Vassar et Citron 2000). La  $\gamma$ -secrétase est un complexe transmembranaire composé de plusieurs protéines, les présénilines existant sous deux isoformes, PS1 et PS2, la nicastrine, l'*anterior pharynx defective 1* ou Aph-1 et le *presenilin enhancer 2* ou Pen-2 (Steiner et coll. 2002 ; Yang et coll. 2002 ; Edbauer et coll. 2003 ; Kimberly et coll. 2003 ; Takasugi et coll. 2003). La préséniline est une protéine transmembranaire avec une activité aspartyl protéase qui clive des substrats transmembranaires. Des mutations de PS1 et PS2 ont été identifiées dans les formes familiales de la maladie d'Alzheimer (Selkoe 1996 ; Hutton et coll. 1998b). Ces mutations chez la souris conduisent à une augmentation de la production de peptide  $\beta$ -amyloïde (Scheuner et coll. 1996 ; Borchelt et coll. 1997) suggérant ainsi un rôle central de la préséniline dans l'activité  $\gamma$ -secrétase (Vassar et Citron 2000).



**Figure 13 : Représentation schématique de la  $\gamma$ -secrétase.** La  $\gamma$ -secrétase est un complexe transmembranaire constitué par l'association de Aph-1, préséniline, nicastrine et Pen-2. Mattson 2004.

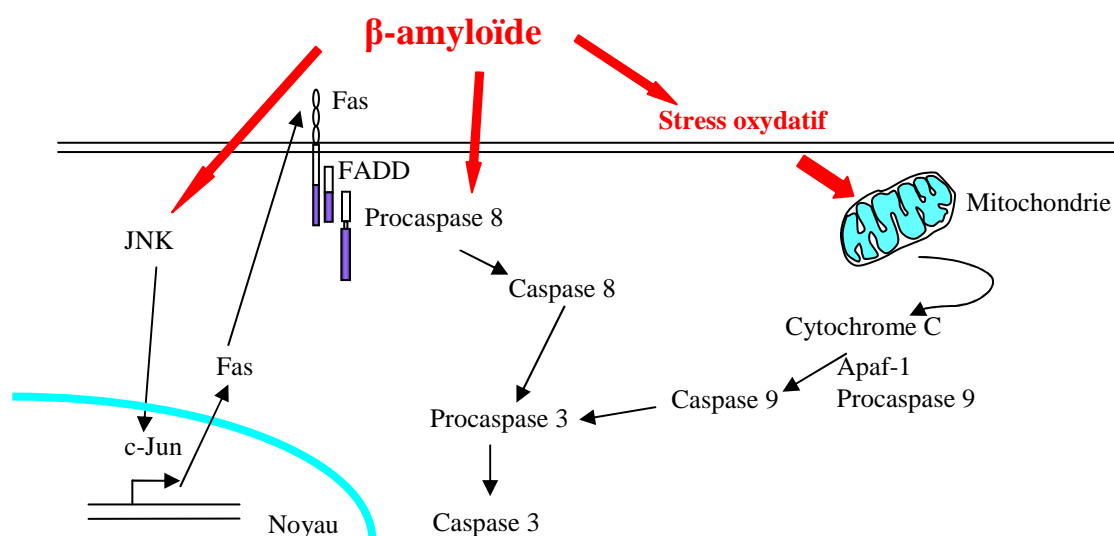


### **II.1.2. Processus neurodégénératifs et peptide $\beta$ -amyloïde**

Su et collaborateurs ont été les premiers à suggérer que l'apoptose est un processus physiopathologique intervenant dans la maladie d'Alzheimer (Su et coll. 1994). Depuis, d'autres travaux ont montré que l'augmentation de la production et l'accumulation de peptide A $\beta$  induisent une neurotoxicité en activant les processus apoptotiques (LaFerla et coll. 1995 ; Li et coll. 1996 ; Cotman 1998 ; Harada et Sugimoto 1999 ; Vickers et coll. 2000 ; Eckert et coll. 2001). Par exemple, l'exposition de cellules PC12 ou de neurones hippocampiques en culture au peptide A $\beta$  active les caspases 1, 2 et 3 qui conduisent à la mort cellulaire (Jordan et coll. 1997 ; Troy et coll. 2000). Ainsi, le peptide A $\beta$  semble être la cause primaire de la maladie d'Alzheimer. Toutefois, les mécanismes de toxicité d'A $\beta$  ne sont pas encore complètement connus et diverses pistes sont actuellement étudiées. Un des mécanismes principaux de toxicité induite par le peptide A $\beta$  est lié à sa capacité à induire un stress oxydatif par la production de radicaux libres (Butterfield et coll. 1994 ; Hensley et coll. 1994 ; Benzi et Moretti 1995 ; Smith et coll. 1998 ; Varadarajan et coll. 2000). Les radicaux libres, qui ont diverses cibles dans la cellule, induisent une peroxydation des lipides (Lovell et coll. 1997 ; Markesbery et Lovell 1998 ; Butterfield et coll. 2002) ainsi qu'une oxydation des acides nucléiques (Lovell et coll. 1999) et des protéines (Hensley et coll. 1995, 1998 ; Smith et coll. 1997).

Le stress oxydatif induit par le peptide A $\beta$  entraîne également un dysfonctionnement de la mitochondrie (Eckert et coll. 2003). Par exemple, l'A $\beta$  perturbe l'activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale, notamment la fonction de la cytochrome c oxydase (Parker et coll. 1994 ; Canevari et coll. 1999 ; Casley et coll. 2002a, b). De plus, la toxicité du peptide A $\beta$  pour la mitochondrie est liée à une augmentation de la production de monoxyde d'azote (NO) qui conduit à un déficit en ATP et à une production plus importante de protéines pro-apoptotiques telles que Bcl-2 et Bax (Paradis et coll. 1996 ; Keil et coll. 2004). Les

changements de la perméabilité de la membrane mitochondriale entraînent la libération de cytochrome c et des AIF, ce qui active la voie apoptotique intrinsèque via la caspase 9. Le stress oxydatif induit par l'A $\beta$  est également lié à la production de peroxyde d'hydrogène ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui est aussi capable de déclencher la voie apoptotique intrinsèque en perturbant complètement l'activité mitochondriale (**Figure 14**) (Behl et coll. 1994 ; Schubert et coll. 1995 ; Tabner et coll. 2005). L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et l'A $\beta$  peuvent aussi activer la voie apoptotique extrinsèque via la JNK et les caspases 2 et 8 (**Figure 14**) (Morishima et coll. 2001 ; Marques et coll. 2003 ; Tamagno et coll. 2003). Les voies intrinsèque et extrinsèque activées par le peptide A $\beta$  ou l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> convergent vers la stimulation des caspases effectrices parmi lesquelles se trouve la caspase 3 (**Figure 14**) (Eckert et coll. 2003).



**Figure 14 :** Représentation schématique de l'activation de l'apoptose par le peptide  $\beta$ -amyloïde.

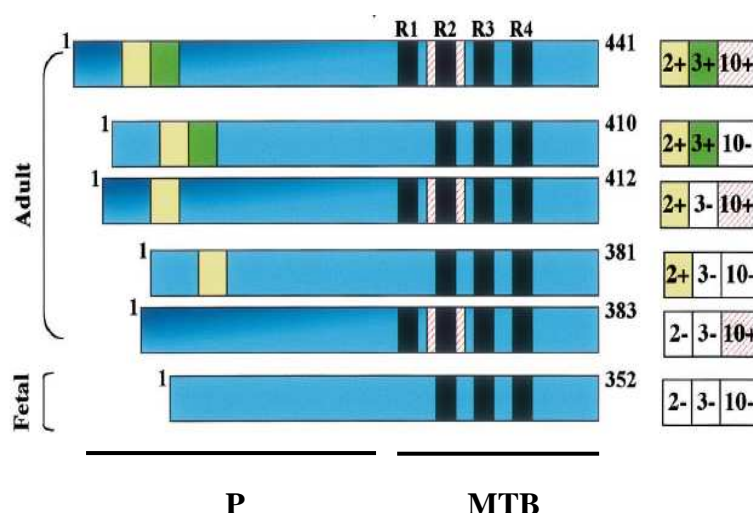
Un autre mécanisme de toxicité du peptide A $\beta$  passe par l'activation de la microglie, entraînant ainsi une réponse inflammatoire et la libération de cytokines neurotoxiques (McGeer et McGeer 2002). Il semble que l'activation de la microglie conduit elle aussi à la production de radicaux libres amplifiant ainsi le stress oxydatif induit par l'A $\beta$  (Colton et Gilbert 1987 ; Boje et Arora 1992 ; Meda et coll. 1995 ; Bianca et coll. 1999).

Enfin, le peptide A $\beta$  provoque un dysfonctionnement et une perte des synapses qui sont des évènements précoces dans l'évolution de la pathologie Alzheimer (Selkoe 2002 ; Oddo et coll. 2003 ; Bell et Cuello 2006). Certains travaux suggèrent que l'A $\beta$  initierait les cascades apoptotiques au niveau de la synapse qui est très riche en mitochondries (Chan et coll. 2002 ; Mattson et Liu 2002 ; Eckert et coll. 2003). Le peptide A $\beta$  pourrait également perturber l'homéostasie du calcium en interférant avec les canaux calciques voltage-dépendants de type L (Davidson et coll. 1994 ; Ueda et coll. 1997) et en augmentant l'activation des récepteurs NMDA via un accroissement de la libération de glutamate (Aksenov et coll. 1995 ; Le et coll. 1995 ; Noda et coll. 1999). Il en résulterait un excès de calcium intracellulaire qui activerait les NO synthases neuronales et entraînerait alors la production d'une quantité importante de NO toxique pour les cellules (Hirai et coll. 2001 ; Anandatheerthavarada et coll. 2003). Le NO exerce son action cytotoxique par deux mécanismes distincts. Il peut, d'une part, induire un stress oxydatif qui conduit à l'oxydation et à l'altération fonctionnelle de nombreuses protéines (Beckman et coll. 1994). D'autre part, le NO active des processus apoptotiques impliquant les caspases 1 et 3 (Tamatani et coll. 1998 ; Matsuzaki et coll. 1999).

## II.2. La protéine tau

### II.2.1. Présentation de la protéine tau

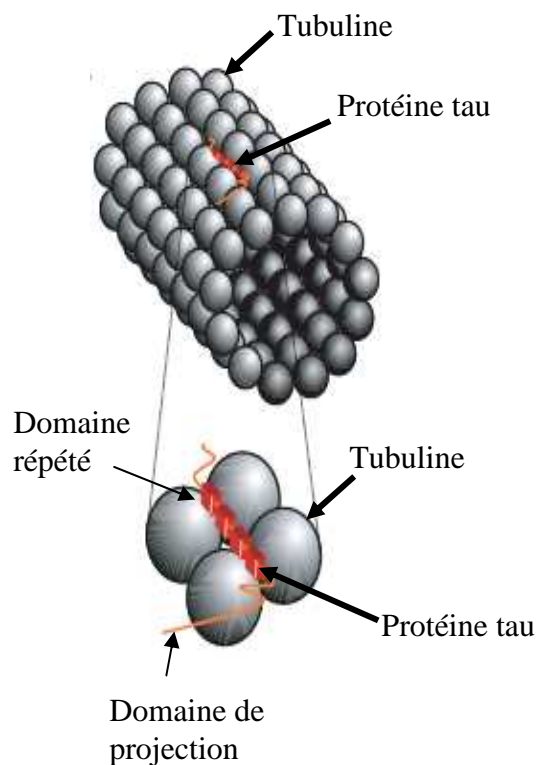
En dehors des plaques amyloïdes, les autres lésions caractéristiques présentes dans le cerveau des patients Alzheimer sont des dégénérescences neurofibrillaires constituées par des agrégats intracellulaires de protéines tau anormalement ou hyper-phosphorylées (Grundke-Iqbal et coll. 1986a,b ; Kosik et coll. 1986 ; Goedert et coll. 1988). La protéine tau est une protéine associée aux microtubules que l'on retrouve principalement dans les axones des neurones (Weingarten et coll. 1975 ; Witman et coll. 1976). Il existe 6 isoformes différentes de protéine tau produites par épissage alternatif (**Figure 15**). Ces isoformes se distinguent dans leur partie N-terminale (appelée domaine de projection) par la présence ou l'absence de l'exon 3. Différentes activités ont été attribuées à ce domaine de projection dont une action dans l'espacement entre les microtubules (Chen et coll. 1992) ou un rôle de liaison avec d'autres protéines du cytosquelette (Hirokawa et coll. 1988) ou de la membrane cytoplasmique (Brandt et coll. 1995 ; Arrasate et coll. 1997, 2000). Dans leur partie C-terminale qui constitue le domaine de liaison aux microtubules, les isoformes de la protéine tau présentent 3 ou 4 domaines répétés de 31 ou 32 acides aminés (Goedert et coll. 1989a, b ; Goedert et Jakes 1990) (**Figure 16**).



**Figure 15 : Les différentes isoformes de la protéine tau.** On retrouve dans les isoformes une région P qui est le domaine de projection de la protéine tau et le domaine de liaison aux microtubules (MTB). Les isoformes contiennent 3 ou 4 domaines répétés (R1-R4) dans leur domaine de liaison aux microtubules (MTB). Les isoformes se distinguent dans la région N-terminale par la présence des exons 2 (blanc) ou 3 (vert).

Buée et coll. 2000.

La protéine tau permet de stabiliser les microtubules qui peuvent ainsi assurer leur fonction de transport axonal et favoriser la croissance neuritique (Caceres et Kosik 1990 ; Caceres et coll. 1991 ; Ebner et coll. 1998 ; Buée et coll. 2000 ; Paglini et coll. 2000 ; Terwel et coll. 2002). L'interaction de tau avec la tubuline dépend de l'état de phosphorylation de la protéine tau qui présente de nombreux sites de phosphorylation, en particulier sur les acides aminés sérine et thréonine. Différentes kinases peuvent phosphoryler la protéine tau mais la glycogène synthase kinase 3 (GSK3) ou *tau protein kinase I* semble jouer un rôle déterminant dans la régulation de la protéine dans des conditions physiologiques et pathologiques ; en plus des phosphorylations, la protéine tau peut subir d'autres modifications post-traductionnelles telles que des glycosylations (Buée et coll. 2000 ; Avila et coll. 2004).



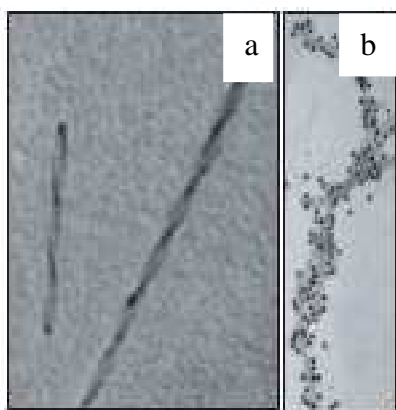
*Figure 16 : Schéma de la liaison de la protéine tau aux microtubules. La liaison de la protéine tau au dimère de tubuline est représentée en agrandissement.*

*Avila et coll. 2004.*

## II.2.2. Tau dans les dégénérescences neurofibrillaires

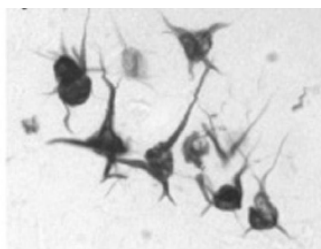
Les dégénérescences neurofibrillaires sont constituées de paires hélicoïdales de filaments (PHF) formées de protéines tau pathologiques hyperphosphorylées et/ou anormalement phosphorylées (Buée et coll. 2000) (**Figures 17 et 18**). Bien que les mécanismes responsables de l'hyperphosphorylation de la protéine tau dans la maladie d'Alzheimer ne soient pas encore bien connus, le rôle central du peptide A $\beta$  est actuellement une piste privilégiée. L'A $\beta$  semble activer les kinases responsables de la phosphorylation de tau notamment la GSK3 (Yankner 1996 ; Alvarez et coll. 1999 ; Ferrari et coll. 2003). Ce lien entre les deux éléments pathogéniques impliqués dans la maladie d'Alzheimer a été suggéré la première fois par Hardy et Higgins (1992) qui ont établi l'hypothèse de la cascade

amyloïde. Dans cette hypothèse, le peptide A $\beta$  est la cause primaire de la pathologie et conduit à la formation des dégénérescences neurofibrillaires. Diverses études permettent maintenant de confirmer cette hypothèse. Par exemple, l'injection intracérébrale d'A $\beta$  semble être nécessaire pour que les souris transgéniques présentant la mutation pathogénique P301L de la protéine tau développent des dégénérescences neurofibrillaires (Götz et coll. 2001b). De même les souris triples transgéniques (pour l'APP, la préséniline et la protéine tau) vaccinées par le peptide A $\beta$  montrent une disparition des agrégats précoces de protéine tau hyperphosphorylée (Oddo et coll. 2003).



**Figure 17 : Paires de filaments hélicoïdaux (a).** Un marquage avec un anticorps dirigé contre la protéine tau montre que les PHF sont constituées de protéine tau (b).

*Avila et coll. 2004*



**Figure 18 : Dégénérescences neurofibrillaires.**

*Buée et coll. 2000.*

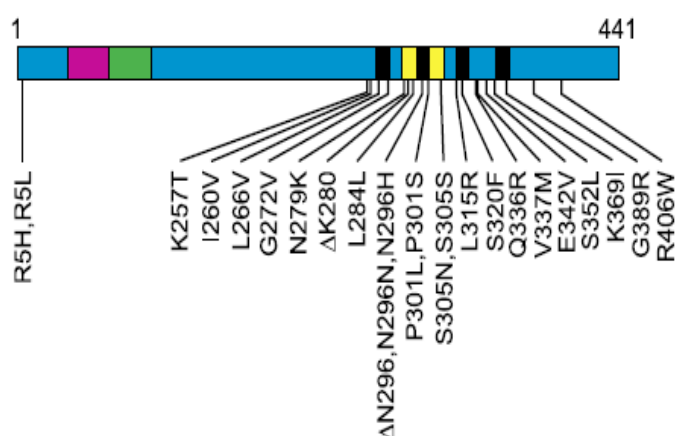
Bien que l'accumulation intracérébrale du peptide A $\beta$  soit toxique, les données sont encore controversées quant à la relation entre la quantité de plaques séniles et la nature ou le degré des problèmes cognitifs induits par la neurodégénérescence liée à la voie amyloïde. En revanche, les dégénérescences neurofibrillaires sont directement associées aux déficits cognitifs aussi bien par leur quantité que par leur localisation (Bierer et coll. 1995 ; Delacourte et coll. 1998, 1999). En effet, l'extension des dégénérescences neurofibrillaires dans le cerveau se fait selon un schéma précis caractéristique et hiérarchique de la région hippocampique vers le cortex temporal, les régions corticales associatives et ensuite les régions primaires motrices et sensitives (Delacourte et coll. 1999). Dix stades d'extension des dégénérescences neurofibrillaires ont été décrites dans le cerveau et la maladie d'Alzheimer correspond aux cas où au moins 7 régions cérébrales sont touchées (Buée et coll. 2000).

### **II.2.3. Les Tauopathies**

Les dégénérescences neurofibrillaires sont caractéristiques de la maladie d'Alzheimer mais on les retrouve aussi dans le cerveau de patients atteints d'autres pathologies. L'ensemble des maladies caractérisées par la présence de dégénérescences neurofibrillaires constitue les tauopathies. Certaines tauopathies, telles que les démences fronto-temporales avec syndrome parkinsonien lié au chromosome 17, sont dues à une mutation du gène de la protéine tau qui est alors constitutivement hyperphosphorylée (Goedert et Jakes 2005) (**Figure 19**). Une de ces mutations intervient au niveau de l'acide aminé 301 et se caractérise par le remplacement d'une proline par une leucine (mutation P301L) (Hutton et coll. 1998a ; Poorkaj et coll. 1998 ; Spillantini et coll. 1998). Bien qu'aucune mutation de la protéine tau ne semble être toute seule responsable de la maladie d'Alzheimer, les formes mutées de la protéine tau ont permis l'avancée des recherches sur le rôle de cette protéine dans la



pathologie (Avila et coll. 2004). Ces mutations ont notamment permis la création de modèles triple transgéniques de souris présentant à la fois une mutation de l'APP, de la préséniline et de la protéine tau. Ces modèles ont l'avantage de développer progressivement des dégénérescences neurofibrillaires et des plaques amyloïdes avec un profil temporel et spatial semblable à celui observé dans la pathologie humaine (Oddo et coll. 2003 ; Billings et coll. 2005).



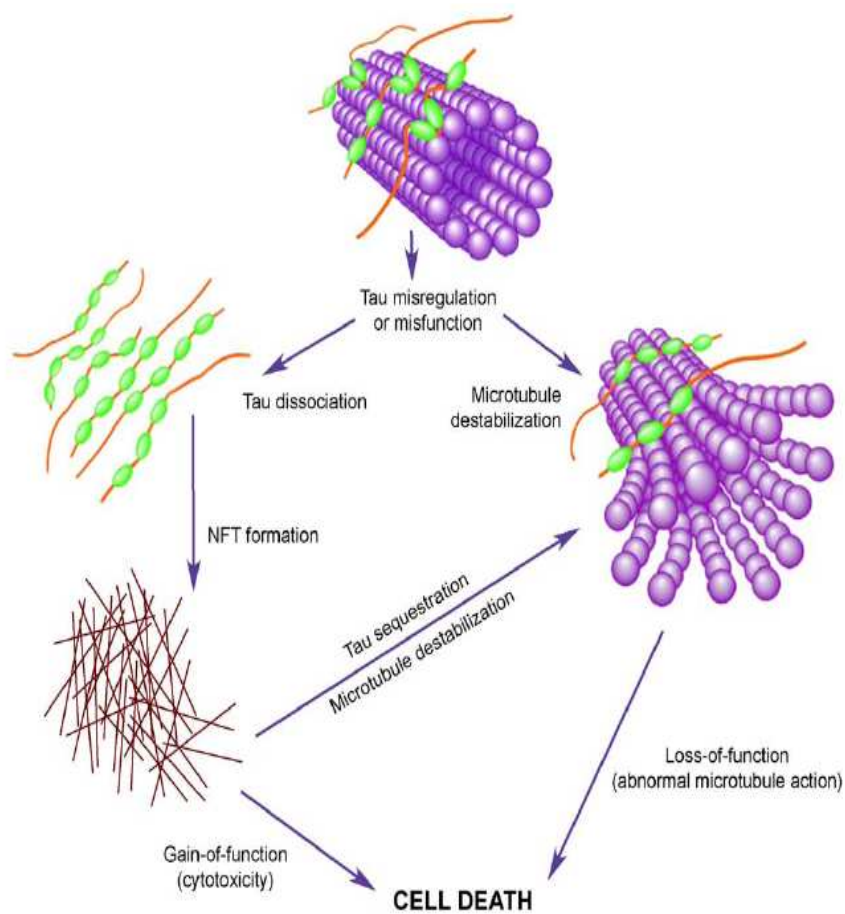
*Figure 19 : Mutations de tau dans les démences fronto-temporales avec un syndrome parkinsonien lié au chromosome 17. Vingt cinq mutations différentes ont été identifiées.*

*Goedert et Jakes 2005*

#### II.2.4. Processus neurodégénératifs et protéine tau

L'hyperphosphorylation de la protéine tau conduit à l'activation de l'apoptose dans différents modèles (Götz et coll. 2001a ; Lucas et coll. 2001 ; Fath et coll. 2002). Les neurones présentant des dégénérescences neurofibrillaires contiennent souvent d'importantes concentrations de protéines pro-apoptotiques telles que la caspase 3 et Bax (Mattson 2000 ; Eckert et coll. 2003). Certains auteurs suggèrent que la protéine tau hyperphosphorylée séquestrerait d'autres protéines associées aux microtubules telles que MAP1B et MAP2 ce qui perturberait l'activité des microtubules, le transport axonal et l'intégrité synaptique (Iqbal et

coll. 1994 ; Alonso et coll. 1996, 1997). En effet, l'agrégation de tau et la perturbation du transport axonal entraînent une mauvaise distribution d'organites qui sont nécessaires à la survie cellulaire tels que les mitochondries et le réticulum endoplasmique (Ebner et coll. 1998 ; Stamer et coll. 2002). L'accumulation des organites aura pour conséquence une dilatation des axones ; on observe alors une dégénérescence axonale et finalement la mort neuronale (Iqbal et coll. 2005). Enfin, une étude relativement récente a montré que la mutation P301L de la protéine tau chez la souris conduit à une diminution de la quantité des protéines de la chaîne respiratoire, des protéines contrôlant la détoxification liée aux radicaux libres et des protéines impliquées dans la transmission synaptique (David et coll. 2005). Les souris portant cette mutation présentent notamment un accroissement des niveaux de radicaux libres et de peroxydes lipidiques. Il apparaît donc que la protéine tau hyperphosphorylée entraîne un dysfonctionnement mitochondrial et un stress oxydatif qui seraient à l'origine de l'activation des voies apoptotiques.



**Figure 20 : Mécanisme de toxicité de la protéine tau.** La dissociation de la protéine tau des microtubules et son agrégation entraînent une déstabilisation des microtubules qui ne peuvent plus assurer leur fonction, ce qui finalement conduit à la mort neuronale. Feinstein et Wilson 2005.

### III. Douleurs neuropathiques

#### III.1. Définition

L'association internationale pour l'Etude de la Douleur ou *International Association for the Study of Pain* (IASP) définit la douleur comme « une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée ou non à des lésions réelles et potentielles, ou décrites en des termes évoquant de telles lésions » (IASP, 1994).

La nociception est l'ensemble des mécanismes permettant la détection de tout stimulus susceptible d'endommager l'intégrité de l'organisme. La nociception diffère donc de la douleur. En effet, la douleur est une interprétation consciente d'un stimulus nociceptif alors que la nociception se limite à la détection et à la transmission du stimulus nociceptif jusqu'au cortex.

D'un point de vue purement physiologique, la douleur constitue un signal d'alarme pour l'organisme lorsqu'un stimulus est susceptible d'endommager son intégrité. La douleur représente un processus adaptatif qui permet à l'organisme d'anticiper face à une situation néfaste. Citons l'exemple du contact de la main avec une plaque chauffante : la douleur vive ressentie suite à la brûlure est un signal d'alarme traduisant la dangerosité de la plaque chauffante. Ainsi, lorsque la même situation se présente à nouveau, l'empreinte mnésique laissée par cette douleur surgit comme un avertissement qui permettra d'éviter de remettre la main sur la plaque chauffante. L'abolition de la douleur physiologique n'est donc pas bénéfique pour l'organisme. Par exemple, les personnes souffrant d'analgésie congénitale constituent un exemple flagrant du rôle indispensable de la douleur physiologique pour la survie de l'individu. En effet, ces personnes meurent généralement jeunes car l'absence de perception de la douleur ne leur permet pas d'éviter des lésions tissulaires graves.

La fonction protectrice de la douleur devient moins évidente au stade de la douleur chronique. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), une douleur devient chronique lorsqu'elle dure plus de 6 mois (Vanhalwyn et Cerexhe 2003). Contrairement à la douleur physiologique, la douleur pathologique perd sa fonction de protection, elle n'a plus aucun objectif biologique ; elle devient même néfaste, destructrice et invalidante pour le patient. La douleur chronique est considérée comme une pathologie à part entière souvent associée à des manifestations dépressives (Nicholson et Verma 2004 ; Gureje 2007).

Parmi les douleurs chroniques, on distingue la douleur inflammatoire qui se manifeste par une sensibilisation périphérique ou centrale (potentialisation, désinhibition, plasticité des connections neuronales...) et les douleurs neuropathiques (Julius et Basbaum 2001 ; Scholz et Woolf 2002).

Anciennement appelées (de manière inappropriée) douleurs par désafférentation, les douleurs neuropathiques sont consécutives à une atteinte (lésion ou section) ou à une perturbation de l'équilibre fonctionnel des systèmes nerveux central et périphérique. Elles surviennent en l'absence de stimulations nocives et sont caractérisées par diverses sensations douloureuses qui sont spontanées ou provoquées :

(1) les douleurs spontanées continues, décrites le plus souvent comme des brûlures, sont parfois associées à des douleurs paroxystiques, perçues comme des décharges électriques ou des éclairs douloureux brefs.

(2) Les douleurs provoquées correspondent aux phénomènes d'allodynie (douleur induite par un stimulus normalement non nocif) et d'hyperalgie (exagération de la réponse douloureuse à un stimulus nociceptif) pouvant être déclenchés par des stimulations mécaniques et thermiques chaudes ou froides. La douleur peut irradier et se prolonger au-delà de la durée du stimulus.

Les mécanismes périphériques et centraux à l'origine des douleurs neuropathiques sont caractérisés par leur complexité. Certains travaux ont montré que des lésions du système nerveux périphérique peuvent secondairement entraîner d'importantes modifications au niveau central, particulièrement dans la corne dorsale de la moelle épinière (Bouhassira 1994 ; Woolf et Mannion 1999). Sur la base d'études réalisées chez l'animal, quatre grands types de mécanismes périphériques ont été mis en évidence : (1) l'apparition de décharges anormales (activités ectopiques) dans les fibres lésées, (2) la sensibilisation des nocicepteurs, (3) les phénomènes d'interactions pathologiques entre fibres nerveuses et (4) les phénomènes dépendant du système sympathique (Woolf et Mannion 1999 ; Grelik et coll. 2005). Les mécanismes périphériques peuvent expliquer à eux seuls certaines caractéristiques cliniques des douleurs neuropathiques mais d'autres arguments expérimentaux impliquent une altération de mécanismes centraux. Trois grands types de mécanismes physiopathologiques, ayant lieu dans la corne dorsale de la moelle épinière peuvent participer à la genèse de la douleur neuropathique : (1) la sensibilisation centrale (ou hyperexcitabilité) des neurones nociceptifs impliquant le récepteur NMDA, (2) la modification des systèmes de modulation de la transmission du message nociceptif et (3) les phénomènes de plasticité responsables d'une activation pathologique des neurones (Woolf et Mannion 1999 ; Bouhassira 2000 ; Woolf et Salter 2000 ; Woolf 2004).

### **III.2. Processus neurodégénératifs et douleur neuropathique**

Qu'ils soient d'origine centrale ou périphérique, les mécanismes physiopathologiques capables de générer des douleurs neuropathiques impliquent souvent des processus de démyélinisation axonale, de dégénérescence cellulaire ou d'activation de l'apoptose dans les structures contrôlant la nociception. Ces processus sont observés dans des pathologies

provoquant des neuropathies telles que la sciatique par hernie discale, la polyneuropathie diabétique, l'entrapement du tronc principal ou d'une collatérale d'un nerf, les algies post-zostériennes (faisant suite à un zona), les accidents vasculaires cérébraux, les traumatismes médullaires, la sclérose en plaque, certains types de cancer, etc (pour revues, Lantéri-Minet 2001 ; Peyron et Laurent 2001).

Les facteurs provoquant une atteinte ou une lésion des structures nerveuses contrôlant les sensations douloureuses peuvent donc être physiques/mécaniques (entrapement d'un nerf, accidents corporels générant un traumatisme périphérique ou central...), métaboliques (hyperglycémie permanente destructrice de la gaine de myéline, dysfonctionnement mitochondrial et stress oxydatif...) et chimiques (toxicité cellulaire par excès de sécrétion glutamatergique et neurotoxicité provoquée par certains anti-cancéreux et anti-viraux). Les processus neurodégénératifs peuvent également résulter d'un défaut d'irrigation des structures nerveuses comme cela est observé à la suite des accidents vasculaires cérébraux, des traumatismes médullaires et des ischémies. Pour étudier les relations entre les processus neurodégénératifs et la genèse des douleurs neuropathiques, divers modèles expérimentaux ont été mis au point. Ces modèles consistent à utiliser chez l'animal les facteurs physiques, chimiques, métaboliques et vasculaires mentionnés ci-dessus pour induire une atteinte ou une lésion du système nerveux avant de rechercher les conséquences sur la sensibilité à la douleur.

### **III.2.1. Modèles de lésion de nerf et douleur neuropathique**

Plusieurs modèles de lésion physique/mécanique de nerf ont été développés et consistent, en général, à réaliser une lésion partielle du nerf sciatique. Ainsi, Bennett et Xie ont mis au point un modèle de douleur neuropathique périphérique qui consiste en quatre ligatures lâches autour du nerf sciatique (Bennett et Xie 1988). Ce modèle a l'avantage de

produire une hyperalgie et une allodynie provoquées par des stimuli thermique (chaud et froid respectivement) et mécanique. Ces caractéristiques symptomatologiques importantes et pernicieuses de la douleur neuropathique se développent à partir du deuxième jour post-opératoire et sont observées chez tous les animaux après ligature du nerf sciatique. De plus, la présence d'une douleur spontanée au niveau du site de lésion est suggérée par l'observation d'une perte d'appétit et des comportements nociceptifs spontanés (léchage, soulèvement soudain de la patte).

Par la suite d'autres modèles de lésion partielle du nerf sciatique ont été développés. Par exemple, le modèle de Bennett et Xie a été adapté par Seltzer qui proposait de réaliser une ligature serrée de 1/3-1/2 de l'épaisseur du nerf sciatique conduisant à l'apparition d'une allodynie mécanique et d'une hyperalgie thermique et mécanique (Seltzer et coll. 1990 ; Hogan 2002). La ligature serrée des nerfs spinaux L5 et L6 du côté distal par rapport aux ganglions spinaux produit également une allodynie et une hyperalgie (Kim et Chung 1992). Enfin, les symptômes de mononeuropathie peuvent également être modélisés par la pose d'un manchon de polyéthylène autour du nerf sciatique (Mosconi et Kruger 1996) ou la ligature serrée de 2 ou 3 branches issues du nerf sciatique (nerfs tibial et péronéal commun) (Decosterd et Woolf 2000).

Tous ces modèles de mononeuropathie induite par la lésion physique/mécanique d'un nerf ont l'avantage de produire une hyperalgie et une allodynie thermiques et mécaniques qui sont des symptômes caractéristiques de beaucoup de douleurs neuropathiques périphériques chez l'humain.

Plusieurs processus neurodégénératifs semblent participer à l'apparition des symptômes douloureux. En effet, une importante démyélinisation précède l'apparition de l'hyperalgie et de l'allodynie dans le modèle de ligature lâche du nerf sciatique puisqu'elle est observée dès le premier jour post-opératoire et persiste au minimum 3 semaines (Bennett et



Xie 1988 ; Munger et coll. 1992). De même, la ligature serrée des nerfs spinaux L5 et L6 ou la pose d'un manchon autour du nerf sciatique entraînent une démyélinisation des axones concomitante à l'installation de l'hyperalgie et de l'allodynie (Mosconi et Kruger 1996 ; Roytta et coll. 1999).

De plus, une dégénérescence wallérienne a été mise en évidence dans le modèle de Bennett et Xie (Gautron et coll. 1990 ; Basbaum et coll. 1991 ; Nuytten et coll. 1992). En effet, les fibres du nerf sciatique dégénèrent progressivement pour atteindre une perte maximale 2 semaines après la ligature lorsque les symptômes douloureux sont le plus développés (Guilbaud et coll. 1993). Les axones dégénèrent également dans les modèles de ligature serrée des nerfs spinaux et de pose du manchon autour du nerf sciatique (Kim et Chung 1992 ; Mosconi et Kruger 1996 ; Roytta et coll. 1999). La dégénérescence wallérienne est un mécanisme central dans l'apparition de l'hyperalgie et de l'allodynie puisque des souris transgéniques qui ne présentent pas de dégénérescence axonale après la lésion d'un nerf ne développent pas de symptômes douloureux (Ramer et coll. 1997).

Il est actuellement bien établi que les processus de démyélinisation et de dégénérescence axonale sont des mécanismes impliqués dans l'apparition de la douleur neuropathique consécutive à la lésion d'un nerf. Certaines études se sont également intéressées à l'implication des processus apoptotiques dans les douleurs neuropathiques. Ainsi, une mort neuronale dans les cornes dorsales de la moelle épinière des animaux neuropathiques a été détectée au bout de 7 à 14 jours dans les modèles de ligature du nerf sciatique ou de ses collatérales et de ligature des nerfs spinaux (Whiteside et Munglani 2001 ; Maione et coll. 2002 ; Scholz et coll. 2005). Les neurones entrant en apoptose seraient des interneurons GABAergiques (Ibuki et coll. 1997 ; Eaton et coll. 1998 ; Moore et coll. 2002) et leur dégénérescence conduirait à une perte d'inhibition favorisant l'apparition de la douleur neuropathique (Scholz et Woolf 2002). Le mécanisme déclencheur de l'apoptose des

interneurones GABAergiques semble être lié au glutamate puisque des antagonistes glutamatergiques permettent d'empêcher l'apoptose et l'apparition de l'hyperalgie thermique (Azkue et coll. 1998 ; de Novellis et coll. 2004). Le glutamate entraînerait une augmentation du calcium cytoplasmique qui favorise la formation de NO. Or, il a été effectivement démontré qu'en cas de douleur neuropathique une accumulation de NO dans les ganglions rachidiens (DRG) et la corne dorsale de la moelle épinière est corrélée à l'hyperalgie (Verge et coll. 1992 ; Steel et coll. 1994 ; Tal 1996 ; Thomas et coll. 1996 ; Cizkova et coll. 2002 ; Naik et coll. 2006). Le NO ainsi que d'autres radicaux libres impliqués dans la douleur neuropathique (Kim et coll. 2004) pourraient alors activer la voie apoptotique intrinsèque au niveau de la mitochondrie. Néanmoins, si certains laboratoires ont détecté une neurodégénérescence dans les cornes dorsales de la moelle épinière, ces études n'ont observé que très peu de cellules en apoptose (Whiteside et Munglani 2001 ; Maione et coll. 2002 ; Scholz et coll. 2005). De plus, les résultats sont très controversés puisque d'autres travaux n'ont pas été en mesure de mettre en évidence une mort neuronale dans les cornes dorsales de la moelle épinière après la lésion du nerf sciatique (Polgár et coll. 2004, 2005).

### **III.2.2. Modèle de neuropathie diabétique : injection de streptozotocine**

Le diabète sucré est une des principales causes de pathologies neuropathiques dans de nombreux pays (Simmons et Feldman 2002). Le modèle le plus communément utilisé pour l'étude de la douleur associée à la neuropathie diabétique est obtenu avec des injections de streptozotocine (STZ). Cette substance empêche la production d'insuline en induisant la mort des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans présentes dans le pancréas (Yamamoto et coll. 1981 ; Turk et coll. 1993 ; Kaneto et coll. 1995). Chez les rats, une simple injection intrapéritonéale de STZ induit une allodynie mécanique (Courteix et coll. 1993 ; Fox et coll. 1999).

Contrairement aux études montrant une hyperalgie thermique marquée chez des rats avec une ligature partielle ou lâche du nerf sciatique (Bennett et Xie 1988 ; Seltzer et coll. 1990), les études sur le modèle STZ apportent des données controversées sur cette caractéristique symptomatique des douleurs neuropathiques (Fox et coll. 1999).

Les neuropathies diabétiques sont caractérisées par un dysfonctionnement des nerfs périphériques liés à une dégénérescence axonale et une démyélinisation (Arezzo et Zotova 2002). En effet, les analyses morphologiques des nerfs périphériques ont montré une démyélinisation 8 à 12 mois après l'injection de STZ (Sima et coll. 1988 ; Yagihashi et coll. 1990a, b ; Jirmanova 1993). De plus, la démyélinisation est précédée par une diminution des niveaux d'expression des protéines composant la myéline telles que P0 et PMP22 en périphérie et MAG ou PLP/DM20 dans le système nerveux central (Kawashima et coll. 2007 ; Leonelli et coll. 2007). Le diabète induit par la STZ semble également conduire à des perturbations du cytosquelette. En effet, 2 à 6 mois après l'injection de STZ les niveaux d'expression des sous-unités composant les neurofilaments ainsi que l' $\alpha$ -tubuline sont diminués dans les fibres fortement et peu myélinisées entraînant ainsi une perturbation du transport axonal et une dégénérescence axonale (Medori et coll. 1988 ; Mohiuddin et coll. 1995 ; Scott et coll. 1999).

L'hyperglycémie chez les animaux diabétiques induit une dégénérescence neuronale par apoptose dans les ganglions rachidiens 3 à 4 semaines après le traitement avec la STZ (Russell et coll. 1999 ; Srinivasan et coll. 2000). Des indices de stress oxydatif provoqué par l'excès de glucose ont été relevés chez des patients diabétiques (Vincent et coll. 2004) ainsi que dans les ganglions rachidiens des animaux traités avec la STZ (Nickander et coll. 1994 ; Schmeichel et coll. 2003). Le stress oxydatif pourrait conduire à un dysfonctionnement mitochondrial et à l'activation de la voie apoptotique intrinsèque. En effet, une diminution des niveaux d'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 ainsi qu'une translocation du

cytochrome c de la mitochondrie vers le cytoplasme ont été observées (Srinivasan et coll. 2000). L'hyperglycémie est bien la cause principale de l'activation des processus de mort cellulaire puisqu'un traitement à l'insuline des animaux permet d'empêcher l'apparition de la neurodégénérescence (Srinivasan et coll. 2000).

Enfin, les polyneuropathies induites par le diabète s'accompagnent également d'une perturbation des fonctions des cellules endothéliales ce qui favoriserait la diminution du flux sanguin et conduirait à une ischémie des nerfs chez les animaux STZ (pour revue, Sima et Sugimoto 1999).

### **III.2.3. Modèles anti-cancéreux**

Les douleurs liées au cancer peuvent être induites par la compression exercée par une tumeur sur un nerf, par des substances pronociceptives et immunoréactives libérées par les tumeurs ou par les traitements anti-cancéreux comme la chimiothérapie ou la chirurgie (pour revue, Portenoy et Lesage 1999). La chimiothérapie induit effectivement deux effets secondaires sévères et fréquents : la neuropathie périphérique et la disparition de la moelle osseuse. Afin de reproduire la douleur liée à la neuropathie périphérique provoquée par la chimiothérapie, plusieurs études ont utilisé la vincristine, une substance alcaloïde administrée dans le traitement de la leucémie aiguë, la maladie de Hodgkin et d'autres maladies avec des lymphomes. La vincristine est utilisée dans le traitement anti-cancéreux car elle peut bloquer la mitose des cellules tumorales en inhibant la polymérisation des microtubules (Himes et coll. 1976 ; Owellen et coll. 1976 ; Lobert et coll. 1996). En 1996, Aley et collaborateurs ont développé un modèle animal de neuropathie provoquée par la vincristine. Chez les rats, l'injection quotidienne de vincristine pendant 10 jours produit une hyperalgie et une allodynie mécanique (Aley et coll. 1996 ; Tanner et coll. 1998b ; Authier et coll. 1999 ; Weng et coll.

2003). Il a été supposé que la désorganisation des microtubules entraînait un déficit du transport axonal et une dégénérescence axonale progressive. De plus, *in vitro* la vincristine provoque une dégénérescence wallérienne des axones (Wang et coll. 2001b ; Watanabe et coll. 2007). Néanmoins, il existe actuellement des données indiquant que les axones ne semblent pas dégénérer chez les animaux rendus neuropathiques par un traitement à la vincristine (Tanner et coll. 1998a ; Topp et coll. 2000). En revanche, l'analyse morphologique en microscopie électronique des nerfs a révélé des atteintes ultrastructurales, notamment une désorganisation des microtubules ainsi qu'un gonflement axonal qui sont concomitants au développement de l'hyperalgie mécanique (Tanner et coll. 1998a ; Topp et coll. 2000). Cette atteinte des fibres serait responsable d'un déficit du transport axonal et d'une altération de la transduction du stimulus nociceptif qui provoqueraient une sensibilisation des nocicepteurs qui répondent à des stimuli mécaniques n'induisant pas de réponse chez les animaux contrôles (Tanner et coll. 1998a, b).

Par ailleurs, une altération de la gaine de myéline, caractérisée par la présence de vacuoles dans les cellules de Schwann, a été observée dans le nerf sciatique des rats traités à la vincristine (Ja'afar et coll. 2006). Enfin, le traitement à la vincristine semble activer des processus apoptotiques car l'inhibition des caspases conduit à l'atténuation de l'hyperalgie mécanique provoquée par la vincristine (Joseph et Levine 2004).

Un autre agent chimiothérapique, le paclitaxel (ou taxol), induit une douleur neuropathique. Il est utilisé dans le traitement de plusieurs cancers tels que les cancers des ovaires et des poumons (Kohler et Goldspiel 1994). Chez les rongeurs traités avec le paclitaxel, la douleur associée au traitement anti-cancéreux se manifeste par l'allodynie et l'hyperalgie thermique et mécanique (Polomano et coll. 2001).

Le paclitaxel a également la particularité de se lier à la tubuline en un site de fixation différent de celui de la vincristine et de bloquer ainsi la dépolymérisation des microtubules (Schiff et

Horwitz 1980 ; De Brabander et coll. 1981 ; Parness et Horwitz 1981 ; Rowinsky et coll. 1988). De plus, le paclitaxel diminue la respiration mitochondriale (Manzano et coll. 1996). Enfin, le paclitaxel entraîne la libération de TNF $\alpha$  (Ding et coll. 1990 ; Burkhart et coll. 1994) probablement via sa fixation à des protéines de la famille des *heat-shock protein-90* (Hsp90) (Byrd et coll. 1999).

#### **III.2.4. Modèle ischémique**

La douleur neuropathique est aussi une conséquence d'une ischémie des nerfs (Weinberg et coll. 2001 ; Lang et coll. 2006). Chez le rat, la lésion ischémique est provoquée par l'exposition du nerf sciatique à un rayonnement laser (Gazelius et coll. 1996 ; Kupers et coll. 1998 ; Hao et coll. 2000). Les animaux soumis à une lésion ischémique développent une hyperalgie et une allodynie provoquées par des stimuli thermiques (chaud et froid) et mécaniques dès le deuxième jour avec un effet maximal 7 jours après l'irradiation. De plus, la douleur spontanée est suggérée par des comportements nociceptifs spontanés tels que le soulèvement de la patte (Kupers et coll. 1998 ; Hao et coll. 2000).

Un processus de démyélinisation ainsi qu'une dégénérescence des axones ont été observés dans ce modèle (Gazelius et coll. 1996 ; Kupers et coll. 1998 ; Hao et coll. 2000). En effet, dès le lendemain de l'irradiation, des signes d'atteinte axonale ont été décrits bien qu'il n'y ait pas encore de perte significative du nombre de fibres (Yu et coll. 2000). Une semaine après l'induction de l'ischémie, lorsque l'allodynie et l'hyperalgie sont les plus prononcées, une importante démyélinisation et dégénérescence axonale sont présentes (Gazelius et coll. 1996 ; Kupers et coll. 1998 ; Hao et coll. 2000 ; Yu et coll. 2000).

### **III.2.5. Modèle de traumatisme médullaire ou section de moelle épinière**

En plus de leurs conséquences motrices, les lésions de la moelle épinière sont souvent accompagnées de douleurs neuropathiques. Un modèle animal de lésion de la moelle épinière couramment utilisé consiste à réaliser une contusion de la moelle épinière chez le rat. Pour cela une pression de 10 grammes est appliquée sur la moelle épinière au niveau T8-T10 et conduit à l'apparition d'une hyperalgie et d'une allodynie thermiques et mécaniques dès le lendemain de la lésion (Siddall et coll. 1995, 1999 ; Hulsebosch et coll. 2000). Les mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'apparition de la douleur neuropathique sont actuellement peu connus. Néanmoins, la contusion de la moelle épinière entraîne la dégénérescence par apoptose des neurones du tractus spino-thalamique qui sont impliqués dans la transmission nociceptive (Qiu et coll. 2001). Cette neurodégénérescence semble être induite par la diminution des niveaux de protéines Bcl-x<sub>L</sub> suggérant ainsi l'implication de la voie apoptotique intrinsèque (Qiu et coll. 2001).

Comme nous l'avons vu avec l'exemple de la maladie d'Alzheimer et des douleurs neuropathiques, les maladies neurodégénératives entraînent de graves conséquences sur la vie des patients. Ainsi, l'identification de molécules neuroprotectrices puissantes peut permettre de lutter efficacement contre ces neuropathologies. Diverses données de la littérature suggèrent que les neurostéroïdes sont des molécules capables de contrôler la neurodégénérescence. Avant d'aborder les arguments en faveur d'un rôle potentiel des neurostéroïdes dans la modulation des processus neurodégénératifs, rappelons dans un premier temps la définition du concept de neurostéroïdes, leurs voies de biosynthèse et leurs mécanismes d'action.

## IV. Neurostéroïdes et contrôle des processus neurodégénératifs

### IV.1. Présentation du concept des neurostéroïdes

#### IV.1.1. Définition

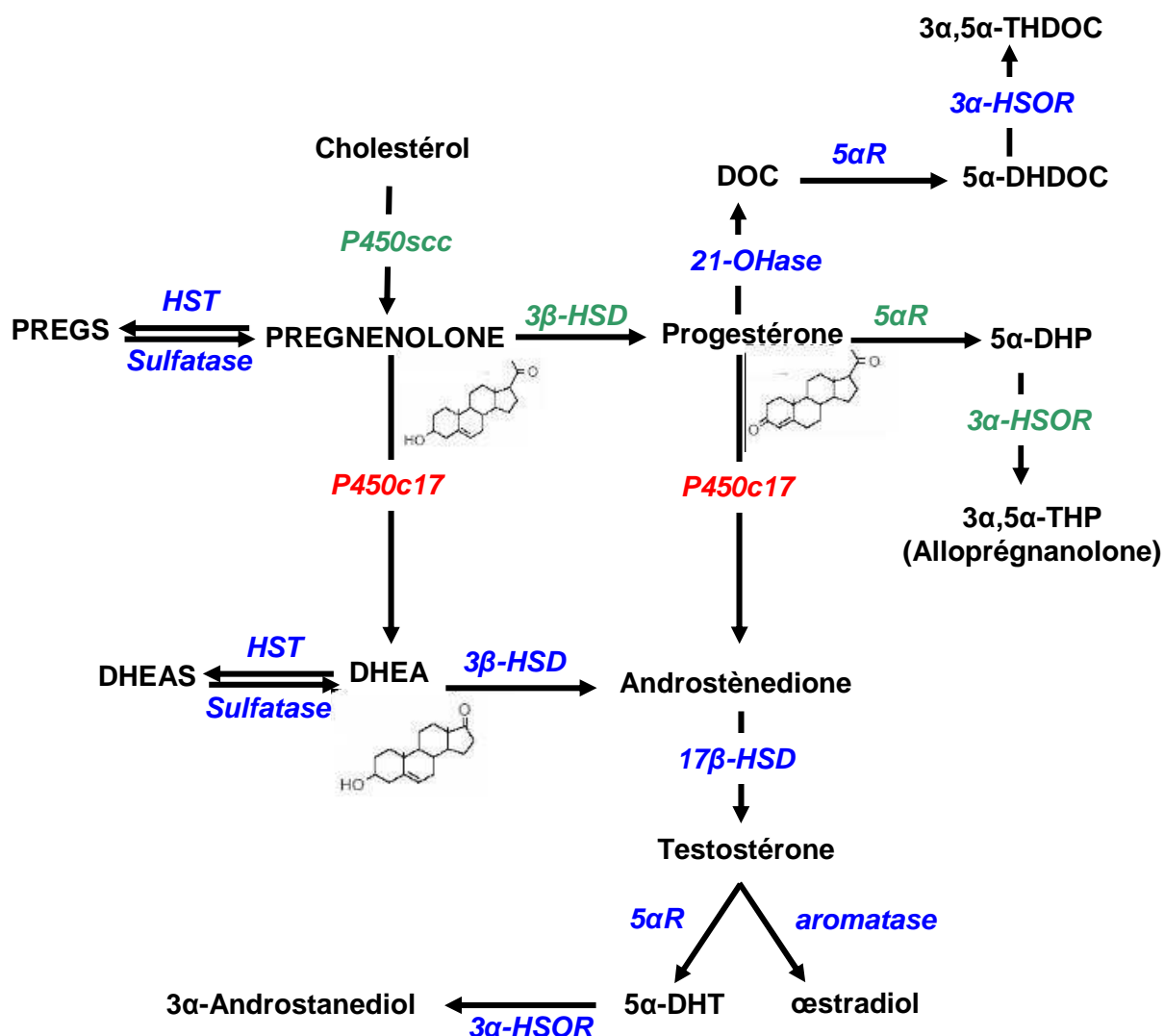
Le terme neurostéroïde désigne les stéroïdes synthétisés *de novo* dans le système nerveux et y persistant après ablation des glandes stéroïdogènes telles que les surrénales, les ovaires et les testicules (Baulieu et coll. 1999 ; Mensah-Nyagan et coll. 1999). Sont appelés stéroïdes neuroactifs, tous les stéroïdes exerçant un effet sur les cellules nerveuses qu'ils soient produits directement dans le système nerveux ou par les glandes endocrines ou qu'ils soient des stéroïdes synthétiques ayant la capacité de franchir la barrière hémato-encéphalique après leur administration. Il est important que les critères suivants soient respectés avant qu'un stéroïde ne soit considéré comme un neurostéroïde.

- (1) Le lieu de synthèse du stéroïde doit être le système nerveux central et/ou périphérique
- (2) Le stéroïde doit être synthétisé par des cellules gliales et/ou des neurones
- (3) Des concentrations substantielles du stéroïde doivent persister dans le système nerveux après ablation des glandes stéroïdogènes périphériques
- (4) Les sites d'action sont membranaires et/ou nucléaires
- (5) Le mode d'action est autocrine et/ou paracrine.

A la suite des travaux de Baulieu et collaborateurs (Corpéchet et coll. 1981, 1983) qui ont suggéré le concept de neurostéroïde, de nombreuses études ayant démontré la présence et l'activité de plusieurs enzymes stéroïdogéniques dans le tissu nerveux ont permis d'asseoir définitivement la notion de biosynthèse de stéroïdes bioactifs dans les cellules nerveuses



(Baulieu et coll. 1999 ; Mensah-Nyagan et coll. 1999 ; Compagnone et Mellon 2000). Ainsi, les voies de la neurostéroïdogenèse ont été identifiées grâce à la localisation dans le système nerveux d'un certain nombre d'enzymes de synthèse des stéroïdes telles que le P450 side-chain-cleavage (P450scc), la 17 $\alpha$ -hydroxylase/17-OH lyase ou cytochrome P450c17 (P450c17), la 3 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase (3 $\beta$ -HSD), la 17 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase (17 $\beta$ -HSD), la 5 $\alpha$ -réductase (5 $\alpha$ R), la 3 $\alpha$ -hydroxystéroïde oxydo-réductase (3 $\alpha$ -HSOR), l'aromatase et l'hydroxystéroïde sulfotransférase (HST) (Mensah-Nyagan et coll. 1999, 2001a, b ; Patte-Mensah et coll. 2006) (**Figure 21**).



**Figure 21 : Voies de biosynthèse des neurostéroïdes.**

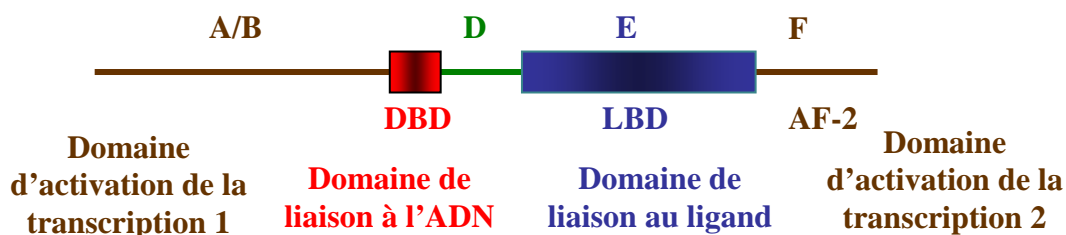
*P450scc* : cytochrome P450 side-chain-cleavage ; *P450c17* : cytochrome P450c17 ou 17α-hydroxylase/17,20 lyase ; 3β-HSD : 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase ; 17β-HSD : 17β-hydroxystéroïde déshydrogénase ; 3α-HSOR : 3α-hydroxystéroïde oxydo-réductase ; 21-OHase : 21-hydroxylase ; 5αR : 5α-réductase ; HST : sulfotransférase.

5α-DHDOC : 5α-dihydrodéoxycorticostérone ; DHEA : déhydroépiandrostérone ; DHEAS : déhydroépiandrostérone sulfate ; 5α-DHP : 5α-dihydroprogestérone ; 5α-DHT : 5α-dihydrotestostérone ; DOC : déoxycorticostérone ; PREGS : prégnénolone sulfate ; 3α,5α-THDOC : 3α,5α-tétrahydrodéoxycorticostérone ; 3α,5α-THP : 3α,5α-tétrahydroprogestérone .

## IV.1.2. Mécanismes d'action

### IV.1.2.1. Actions génomiques

Les stéroïdes neuroactifs y compris les neurostéroïdes exercent leurs effets dans le système nerveux via des récepteurs nucléaires qui sont les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR), aux minéralocorticoïdes (MR), aux androgènes (AR), aux œstrogènes (ER) et aux progestines (PR). Cette voie de signalisation intracellulaire est dite génomique car elle implique l'action des stéroïdes neuroactifs sur le génome en particulier sur la régulation de la transcription de gènes. Les récepteurs nucléaires sont des protéines composées d'un domaine de liaison au stéroïde (*ligand binding domain* ou LBD), d'un domaine de fixation à l'ADN (*DNA binding domain* ou DBD) et de plusieurs autres domaines impliqués dans l'activation de la transcription tels que l'AF1/2 ou *activation function 1 and 2* (Beato et Klug 2000 ; Aranda et Pascual 2001) (**Figure 22**).



**AF 1/2 = Function Activation 1/2**

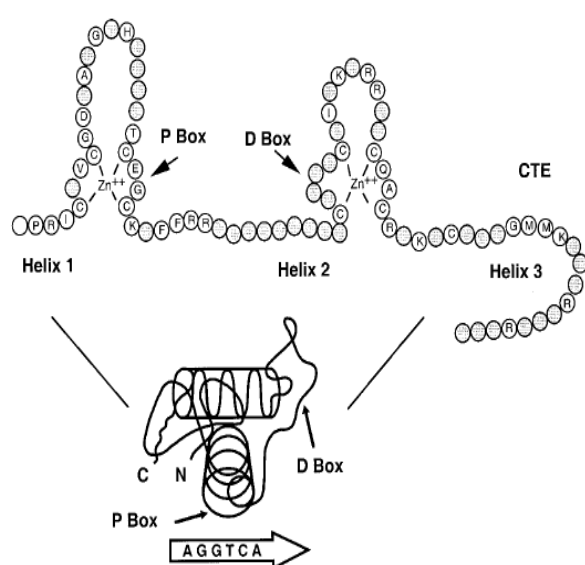
**DBD = DNA Binding Domain**

**LBD = Ligand Binding Domain**

**Figure 22 : Différents domaines des récepteurs nucléaires aux stéroïdes.**

*Beato et Klug 2000.*

Le DBD comprend deux régions configurées en doigt de zinc, l'une (D box) permet la dimérisation des récepteurs et la seconde permet au récepteur de se lier spécifiquement à une séquence consensus d'ADN du gène cible appelée HRE (*hormone response element*) ou élément de réponse aux hormones (Truss et coll. 1990, 1991) (**Figure 23**).

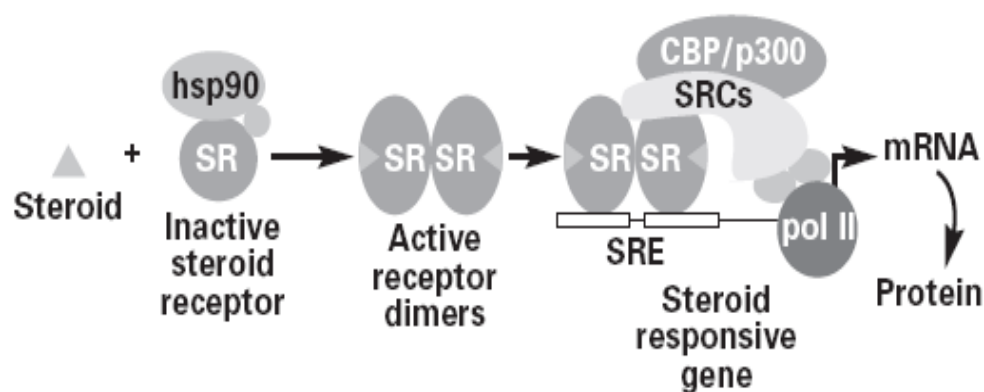


**Figure 23 : Représentation schématique du DBD.** Le DBD comprend un site de dimérisation (D box) et un site de fixation à l'ADN (P box).

Aranda et Pascual 2001.

Le récepteur non lié à son ligand est associé à un large complexe multiprotéique composé de protéines chaperonnes telles que les protéines de choc thermique ou *Heat Shock Protein* (Hsp) qui sont fixées au LBD (Beato et coll. 1996 ; Beato et Klug 2000). La liaison du stéroïde au récepteur induit un changement de conformation de celui-ci qui aboutit à une dissociation des protéines Hsp du récepteur. Les récepteurs dimérisés et associés à leur ligand forment avec des facteurs de transcription généraux (GTF ou *General Transcription Factors*) et/ou avec des co-activateurs appelés aussi facteurs de transcription intermédiaires (*Transcription Intermediary Factors* ou TIF), un complexe d'initiation à la transcription au

niveau du site de départ de la transcription (*Initial Transcription site* ou IT) situé sur le promoteur du gène cible (Beato et Klug 2000 ; Aranda et Pascual 2001). Actuellement, de nombreux co-activateurs ont été identifiés tels que la famille p160 qui contient SRC1 (*Steroid Receptor Co-activator-1*), SRC2 (GRIP1) et SRC3 qui interagissent avec le domaine AF2 des PR, GR et ER $\alpha$  (Onate et coll. 1995 ; Beato et Klug 2000). Les co-activateurs p160/SRC recrutent des co-activateurs secondaires comme le CBP (*cAMP Response Element Binding Protein*) ou son homologue p300 (Tetel 2000) ou encore *CBP-Associated Factor* (PCAF) (Blanco et coll. 1998) (**Figure 24**). Tous ces co-activateurs ont une activité histone acétyltransférase qui permet le remodelage de la chromatine et l'accès à l'ADN de la machinerie transcriptionnelle (RNA polymérase II et GTF) (Bannister et Kouzarides 1996 ; Ogryzko et coll. 1996 ; Spencer et coll. 1997 ; Aranda et Pascual 2001).



**Figure 24 : Modèle d'activation transcriptionnelle par les récepteurs des stéroïdes.**

SR : récepteur des stéroïdes ; hsp90 : heat shock protein 90 ; SRE steroid response element ; SRCs : famille des steroid receptor coactivator p160 ; CBP/p300 : CREB-binding protein/p300 ; Pol II : RNA polymérase II.

Tetel 2000.

Ce modèle général d'activation de la transcription par les récepteurs des stéroïdes peut présenter des variations. Dans une lignée de cellules de Schwann, il a été montré que les co-activateurs du récepteur des glucocorticoïdes sont SRC1 et la  $\beta$ -caténine qui module aussi l'activité transcriptionnelle des AR et ER (Kouzmenko et coll. 2004). Le p300 ne joue pas le rôle de co-activateur mais de co-répresseur des récepteurs des glucocorticoïdes dans le modèle présenté (Fonte et coll. 2005).

#### **IV.1.2.2. Actions non génomiques**

Dès 1942, les résultats obtenus par Selye ont montré que l'injection intrapéritonéale de progestérone induisait, après quelques minutes, un effet anesthésique rapide. Klein et Henk (1963) ont également montré que l'administration d'aldostérone provoque au bout de 5 minutes des effets cardiovasculaires. Ce court délai d'action des stéroïdes neuroactifs n'est pas compatible avec un mécanisme génomique mais suggère plutôt un effet membranaire. Depuis, de nombreuses études ont montré que les stéroïdes neuroactifs et les neurostéroïdes contrôlent l'activité des cellules nerveuses par l'intermédiaire de récepteurs membranaires tels que le récepteur GABA<sub>A</sub> (Majewska 1992 ; Belelli et Lambert 2005), NMDA (Mellon et Griffin 2002), sigma (Monnet et coll. 1995 ; Bergeron et coll. 1996 ; Debonnel et coll. 1996) et P2X (De Roo et coll. 2003). Par ailleurs, le clonage récent d'un récepteur membranaire des progestatifs chez diverses espèces de vertébrés, y compris l'Homme, suggère que les neurostéroïdes pourraient également agir via des récepteurs propres des stéroïdes couplés aux protéines G (Thomas et coll. 2002 ; Zhu et coll. 2003a, b). Des travaux récents ont révélé que la DHEA se fixe sur un site membranaire de liaison spécifique couplé à une protéine G dans les cellules dérivant de la crête neurale et dans les cellules endothéliales aortiques d'origine bovine (Liu et Dillon 2002, 2004 ; Charalampopoulos et coll. 2006). L'existence d'un récepteur membranaire des œstrogènes a été suggéré par l'utilisation d'anticorps dirigés

contre le récepteur nucléaire aux œstrogènes ER $\alpha$  qui a révélé un immunomarquage de protéines membranaires de cellules hypophysaires (Pappas et coll. 1995). De plus, l'analyse dans des cellules septales et hippocampiques du récepteur membranaire des œstrogènes a révélé que ce récepteur présente une importante homologie de structure avec le récepteur nucléaire ER $\alpha$  (Marin et coll. 2006). Les ER membranaires sont impliqués dans la régulation des canaux ioniques et de la voie MAPK (Nakajima et coll. 1995 ; Simoncini et coll. 2000, 2004 ; Guerra et coll. 2004).

L'ensemble de ces données démontre l'existence d'un mode d'action membranaire des neurostéroïdes.

#### **IV.2. Données bibliographiques en faveur d'un rôle neuroprotecteur des neurostéroïdes**

Plusieurs études chez l'animal indiquent que les neurostéroïdes et les stéroïdes neuroactifs participent à la régulation des mécanismes neurodégénératifs (Koenig et coll. 1995 ; Melcangi et coll. 2003 ; Schumacher et coll. 2004).

Dans le système nerveux périphérique, l'action neurotrophique des neurostéroïdes a été bien démontrée. En effet, la progestérone et ses dérivés, la 5 $\alpha$ -dihydroprogestérone (5 $\alpha$ -DHP) et la 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -tétrahydroprogestérone (3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP ou encore appelée allopregnanolone), empêchent la dégénérescence nerveuse et favorisent la formation des gaines de myéline après lésion du nerf sciatique (Koenig et coll. 1995 ; Desarnaud et coll. 1998 ; Jung-Testas et coll. 1999 ; Schumacher et coll. 2004), ou après démyélinisation (Melcangi et coll. 1998, 2000, 2003 ; Azcoitia et coll. 2003 ; Sereda et coll. 2003 ; Leonelli et coll. 2007). L'action promyélinisante dépend de la capacité des neurostéroïdes à stimuler l'expression des protéines constitutives de la myéline telles que P0 et PMP22 (Martini et coll. 2003).

Dans le système nerveux central, l'action neuroprotectrice des neurostéroïdes et des stéroïdes neuroactifs a été montrée dans divers modèles tels que des modèles de traumatisme crânien, de transection de la moelle épinière et de cytotoxicité à l'acide kainique (Jiang et coll. 1996 ; Chen et coll. 1999 ; Roof et Hall 2000 ; Stein 2001). Par exemple, il a été montré que les niveaux d'ARNm codant la  $3\beta$ -HSD sont diminués au niveau du site de lésion dans le modèle de traumatisme crânien (Meffre et coll. 2007). Le traitement des animaux à la progestérone permet de réduire la taille de l'œdème cérébral, l'inflammation et la mort cellulaire, ce qui entraîne une meilleure récupération fonctionnelle (Cutler et coll. 2006 ; VanLandingham et coll. 2006). Les résultats obtenus chez l'animal sont confirmés par une étude clinique de phase II qui a montré que le traitement à la progestérone améliore également la récupération des patients atteints de traumatisme crânien (Wright et coll. 2007). Outre la progestérone, l'action neuroprotectrice de la  $3\alpha,5\alpha$ -THP a été aussi mise en évidence dans le modèle de traumatisme crânien. La  $3\alpha,5\alpha$ -THP, tout comme la progestérone, diminue la mort cellulaire, la gliose réactionnelle et les déficits fonctionnels (Djebaili et coll. 2005).

Dans la moelle épinière, les concentrations endogènes de progestérone et de ses dérivés, la  $5\alpha$ -DHP et la  $3\alpha,5\alpha$ -THP, augmentent après une transection, ce qui suggère une participation de ces neurostéroïdes à la régulation des processus dégénératifs (di Michele et coll. 2000 ; Labombarda et coll. 2006). En effet, la progestérone empêche la dégénérescence des motoneurones spinaux après lésion de la moelle épinière ou après axotomie (Yu 1989 ; Thomas et coll. 1999). Par ailleurs, l'activité neuroprotectrice de la progestérone a été également bien démontré chez la souris wobbler qui est un modèle de sclérose latérale amyotrophique (Gonzalez Deniselle et coll. 2002 ; Schumacher et coll. 2004). Il est intéressant de noter qu'un traitement à la prégnénolone, le précurseur de la progestérone, chez des rats dont la moelle épinière a été lésée entraîne également une amélioration de l'activité locomotrice (Guth et coll. 1994).



Chez des souris transgéniques reproduisant les symptômes de la maladie de Niemann-Pick de type C qui est une atteinte neurodégénérative, la synthèse de  $3\alpha,5\alpha$ -THP est fortement diminuée. Le traitement des souris avec la  $3\alpha,5\alpha$ -THP permet de retarder l'apparition de la pathologie et d'atténuer la sévérité des symptômes (Griffin et coll. 2004).

Des effets neuroprotecteurs de la DHEA et de la DHEAS dans des modèles d'ischémie et d'excitotoxicité induite par le glutamate ont été mis en évidence (Kimonides et coll. 1998 ; Mao et Barger 1998 ; Lapchak et coll. 2000 ; Li et coll. 2001a).

Enfin l'œstradiol intervient également dans le contrôle des processus neurodégénératifs (Garcia-Segura et coll. 2001, 2003). En effet, l'inhibition de l'aromatase ou l'inactivation de l'expression de cette enzyme fait que des faibles doses d'acide kaïnique ou d'acide domoïque qui sont normalement non toxiques deviennent cytotoxiques et entraînent la mort neuronale (Azcoitia et coll. 2001; Veiga et coll. 2005). Il a également été montré que des souris *knock out* pour l'aromatase présentent des dommages plus importants à l'issue d'une ischémie cérébrale (McCullough et coll. 2003). Ainsi, l'inhibition de la synthèse d'œstradiol accroît la susceptibilité des neurones à la neurodégénérescence. Dans l'hippocampe lésé, une régulation positive de l'expression de l'aromatase a été observée dans les astrocytes se trouvant autour du site de lésion. Cette surexpression de l'aromatase est corrélée à une surproduction d'œstradiol, ce qui pourrait constituer un mécanisme compensatoire permettant de limiter la neurodégénérescence (Garcia-Segura et coll. 1999a, b).

Le mécanisme d'action des neurostéroïdes neuroprotecteurs n'est actuellement pas connu. Néanmoins, l'action neuroprotectrice de l'œstradiol contre l'A $\beta$  implique des effets génomiques (Kim et coll. 2001 ; Fitzpatrick et coll. 2002 ; Marin et coll. 2003a). En effet, l'œstradiol active l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub> (Garcia-Segura et coll. 1998 ; Singer et coll. 1998 ; Wu et coll. 2005). De plus, l'œstradiol exerce un effet protecteur plus rapide médié par le récepteur membranaire qui active la voie Raf-

1/MEK/ERK (Marin et coll. 2003b ; Guerra et coll. 2004) et conduit à l'inhibition des caspases (Zhang et coll. 2001). La progestérone et la  $3\alpha,5\alpha$ -THP augmentent également l'expression des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et inhibent l'activation de protéines pro-apoptotiques Bax et Bad (Nilsen et Brinton 2002 ; Charalampopoulos et coll. 2004 ; Djebaili et coll. 2005 ; Yao et coll. 2005). Enfin, les neurostéroïdes peuvent aussi diminuer la gliose réactionnelle (Garcia-Estrada et coll. 1999 ; Hoyk et coll. 2004).

L'ensemble de ces études réalisées chez l'animal suggère que les neurostéroïdes ont des propriétés neuroprotectrices intéressantes. Néanmoins, chez l'Homme il n'existe aucune donnée démontrant clairement un potentiel neuroprotecteur des neurostéroïdes. Seules ont été réalisées quelques études visant à corrélérer les niveaux de stéroïdes ou de neurostéroïdes avec la sévérité des symptômes ou avec le risque de développer une pathologie neurodégénérative.

#### **IV.3. Implication potentielle des neurostéroïdes dans la maladie d'Alzheimer**

Des études visant à établir un lien entre la maladie d'Alzheimer et les hormones stéroïdiennes ont été initiées il y a quelques années (Sunderland et coll. 1989 ; Leblhuber et coll. 1993 ; Carlson et coll. 1999). Ainsi, plusieurs tentatives visant à corrélérer les niveaux plasmatiques de stéroïdes tels que le cortisol, la DHEA ou son dérivé sulfaté (DHEAS) avec la sévérité des symptômes des patients Alzheimer ont été réalisées mais ces tentatives ont générées des résultats contradictoires difficilement exploitables (Davis et coll. 1985 ; Näsman et coll. 1991, 1995 ; Weiner et coll. 1993 ; Legrain et coll. 1995 ; Hillen et coll. 2000 ; Murialdo et coll. 2000, 2001 ; Rasmuson et coll. 2002). La variabilité des résultats peut être liée aux techniques de dosages utilisées. En effet, ces études ont toutes utilisées la technique de dosage radioimmunologique ou RIA dont la sensibilité n'est pas toujours élevée comparée aux méthodes actuelles utilisant le couplage chromatographie en phase gazeuse (GC) ou bien

la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) avec la spectrométrie de masse (MS) (Melcangi et Mensah-Nyagan 2007). En effet, en utilisant la GC-MS, une série d'études réalisée au cours de la dernière décennie a mesuré les niveaux de DHEA, DHEAS, prégnénolone et prégnénolone sulfate (PREGS) dans le liquide céphalo-rachidien de patients atteints de maladie d'Alzheimer et dans des cerveaux post mortem (Weill-Engerer et coll. 2002 ; Kim et coll. 2003). Ces études, qui ont observé une bonne corrélation entre la diminution des concentrations de DHEAS et de PREGS et la démence des patients Alzheimer, suggèrent que les niveaux des neurostéroïdes endogènes semblent être plus appropriés que les taux plasmatiques de stéroïdes pour établir un lien causal avec la maladie d'Alzheimer.

#### **IV.4. Action potentielle des neurostéroïdes dans le contrôle des douleurs neuropathiques**

Comme nous l'avons détaillé dans le chapitre sur les mécanismes d'action (pages 66 à 70), il ressort que les neurostéroïdes seraient capables de moduler simultanément les systèmes GABAergique (Majewska 1992 ; Belelli et Lambert 2005), glutamatergique (Mellon et Griffin 2002) et purinergique (De Roo et coll. 2003) qui jouent un rôle crucial dans la transmission des messages nociceptifs et dans la modulation des sensations douloureuses (Millan 1999, 2002).

Par ailleurs, des travaux récents de notre équipe ont mis en évidence, dans les structures nerveuses contrôlant la nociception, la présence et l'activité des enzymes de synthèse des neurostéroïdes telles que le P450scc, le P450c17, le 3 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase (3 $\beta$ HSD), la 3 $\alpha$ -hydroxystéroïde oxydo-réductase (3 $\alpha$ HSOR) et la 5 $\alpha$ -réductase ou 5 $\alpha$ R (Patte-Mensah et coll. 2003, 2004b, 2005). L'expression du gène codant le P450scc de même que son activité biologique sont augmentées dans la corne dorsale de la

moelle épinière de rat développant les symptômes d'une douleur chronique neuropathique (Patte-Mensah et coll. 2004a). La distribution cellulaire de la protéine P450scc est également modifiée au sein des réseaux neuronaux de la moelle épinière au cours du développement de la douleur neuropathique, ce qui suggère que le P450scc pourrait être impliqué dans le contrôle de la plasticité structurale observée dans le système nerveux central lors des situations de douleurs chroniques (Woolf et Salter 2000 ; Patte-Mensah et coll. 2004a). A l'inverse du P450scc, l'expression et l'activité du P450c17 sont réprimées dans la moelle épinière au cours des douleurs chroniques neuropathiques. L'administration aiguë de DHEA (neurostéroïde synthétisé par le P450c17) induit un effet pro-nociceptif rapide suivi d'un effet analgésique tardif. L'inhibition de la synthèse de DHEA dans la moelle épinière par injection intrathécale de kétoconazole (inhibiteur pharmacologique du P450c17) supprime l'effet pro-nociceptif rapide et induit une analgésie chez les animaux neuropathiques. L'ensemble des résultats obtenus sur le P450c17 et la DHEA suggère que la DHEA exerce une action biphasique sur la douleur : à la suite de son injection la DHEA elle-même (avant d'être métabolisée) induit un effet pro-nociceptif rapide mais les androgènes dérivant du métabolisme de la DHEA provoquent un effet analgésique tardif (Kibaly et coll. 2007). Outre le P450scc et le P450c17, notre équipe a également montré que l'activité réductrice de la  $3\alpha$ -HSOR qui conduit à la formation de  $3\alpha,5\alpha$ -THP est stimulée dans la moelle épinière en situation de douleur neuropathique. De plus, l'administration intrathécale de  $3\alpha,5\alpha$ -THP induit une analgésie alors que l'inhibition au niveau spinal de la  $3\alpha$ -HSOR par la provera est pro-nociceptive (Meyer et coll. soumis). Ainsi, il apparaît qu'il existe une régulation sélective de la neurostéroïdogenèse dans les structures nociceptives au cours de la douleur chronique. Cette régulation entraînerait une activation de la production des neurostéroïdes anti-nociceptifs ( $3\alpha,5\alpha$ -THP) parallèlement à une inhibition de la synthèse des neurostéroïdes pro-nociceptifs (DHEA) pour aider l'animal à s'adapter à l'état permanent de douleur chronique.

Ces mécanismes adaptatifs naturels ne suffisent pas pour autant à soulager la douleur chronique neuropathique qui nécessite un traitement médical. Néanmoins, l'exploitation des connaissances sur ces mécanismes naturels peut permettre de développer des stratégies thérapeutiques efficaces contre les douleurs neuropathiques chroniques. Pour cela, il est important de compléter les données récentes obtenues par notre équipe par l'identification des interactions entre la neurostéroïdogénèse et les facteurs clés régulant les processus neurodégénératifs dans les centres sensoriels qui contrôlent la nociception et la douleur.

## **V. Descriptif du projet de thèse**

### **V.1. Objectifs du programme de recherche**

Les maladies neurodégénératives se caractérisent par une dérégulation des processus contrôlant la protection et la survie des cellules nerveuses, ce qui conduit à la neurodégénérescence ou à la mort neuronale. Malgré le nombre très élevé de personnes atteintes de maladies neurodégénératives en France et dans le monde, il n'existe pas encore de traitement permettant de lutter efficacement contre les neuropathologies dégénératives. Il est donc urgent et crucial pour la recherche biomédicale d'avancer rapidement dans le décryptage des mécanismes impliqués dans l'étiologie des maladies neurodégénératives de façon à proposer des pistes sérieuses pour le développement de stratégies thérapeutiques efficaces contre ces pathologies. Au regard des données bibliographiques exposées dans l'introduction, les neurostéroïdes peuvent devenir une piste intéressante à explorer pour l'élaboration de ces stratégies si les interactions entre la neurostéroïdogénèse et les facteurs et/ou protéines clés impliqués dans la régulation des processus neurodégénératifs sont bien élucidées. Pour contribuer à la compréhension et à l'élucidation de ces interactions, en particulier dans le cas

de deux pathologies neurodégénératives très invalidantes telles que la maladie d'Alzheimer et les douleurs neuropathiques, nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

### **1°) Pour ce qui concerne la maladie d'Alzheimer**

1a. Déterminer l'effet de la surexpression des protéines clés impliquées dans l'étiologie de la maladie d'Alzheimer (tau native, tau mutée P301L et APP) sur la biosynthèse des neurostéroïdes dans les neuroblastomes humains SH-SY5Y.

1b. Réaliser l'analyse comparative des effets des concentrations physiologiques et de doses toxiques des peptides  $\beta$ -amyloïdes 1-42 et 25-35 sur la survie des cellules SH-SY5Y et sur leur capacité à produire des neurostéroïdes.

1c. Vérifier si la neurostéroïdogenèse fait partie des mécanismes inhibés par le stress oxydatif (facteur déterminant dans la neurodégénérescence) pour induire la mort cellulaire.

### **2°) Pour ce qui concerne les douleurs neuropathiques**

2a. Etudier la cinétique d'apparition des processus apoptotiques dans les structures contrôlant la nociception (ganglions rachidiens, moelle épinière) chez des rats développant une douleur neuropathique.

2b. Déterminer les changements intervenant dans la biosynthèse des neurostéroïdes dans les structures nociceptives présentant des foyers apoptotiques.

### **3°) Pour les deux neuropathologies étudiées**

3a. Identifier les neurostéroïdes dont la biosynthèse est affectée significativement par les facteurs étiologiques de la maladie d'Alzheimer ou des douleurs neuropathiques.

3b. Déterminer l'action des neurostéroïdes identifiés dans la protection contre la mort cellulaire, sur la viabilité cellulaire, sur la croissance neuritique et, à plus long terme, dans l'amélioration de l'état physiologique des animaux développant les symptômes des neuropathologies étudiées.

## **V.2. Modèles expérimentaux utilisés**

Pour atteindre nos objectifs, nous avons choisi de travailler avec deux modèles expérimentaux :

- un modèle cellulaire pour l'étude des processus moléculaires et biochimiques impliqués dans la maladie d'Alzheimer, les neuroblastomes humains SH-SY5Y
- un modèle animal de douleur chronique neuropathique qui consiste à ligaturer de façon lâche le tronc commun du nerf sciatique chez le rat (Bennett et Xie 1988).

Les neuroblastomes humains SH-SY5Y, qui possèdent un phénotype et de nombreuses caractéristiques neuronales, sont reconnus comme un modèle cellulaire permettant d'élucider des mécanismes moléculaires et biochimiques impliqués dans l'étiologie de la maladie d'Alzheimer. En effet, les cellules SH-SY5Y sont couramment utilisées et ont déjà permis d'obtenir plusieurs données qui contribuent à l'élucidation des processus moléculaires et cellulaires intervenant dans la maladie d'Alzheimer (Tanaka et coll. 1995 ; Li et coll. 1996 ; Mailliot et coll. 1998 ; Zhong et coll. 1999 ; Misonou et coll. 2000 ; Wang et coll. 2001a ;

Olivieri et coll. 2002 ; Ferrari et coll. 2003 ; Jämsä et coll. 2004). De plus, les cellules SH-SY5Y paraissent très appropriées à nos travaux sur la neurostéroïdogénèse car elles expriment diverses enzymes de synthèse des stéroïdes telles que le P450scc, la 5 $\alpha$ R et l'aromatase (Melcangi et coll. 1993 ; Wozniak et coll. 1998 ; Guarneri et coll. 2000).

Le modèle de Bennett et Xie (1988) utilisé pour nos travaux sur la douleur neuropathique est également bien connu et accepté par les spécialistes. En effet, ce modèle qui a servi dans de nombreuses études sur la douleur est reconnu comme reproduisant de façon intéressante divers symptômes caractéristiques des douleurs neuropathiques chez l'humain tels que l'hyperalgie, l'allodynie, l'apparition de douleurs spontanées et l'extension de la douleur vers des tissus avoisinants le territoire innervé par le nerf sciatique (Hogan 2002 ; Wang et Wang 2003 ; Mochizucki 2004 ; Patte-Mensah et coll. 2006).



## **MATERIELS ET METHODES**

## I. Substances pharmacologiques et produits chimiques

Le *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM), le glutamax, la pénicilline, la streptomycine, le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), le 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) et le propylène glycol ont été fournis par Sigma (St Louis, MO, USA). Le sérum de veau fœtal, le sérum de cheval, le G418 et l'hygromycine ont été achetés chez Gibco (Basel, Suisse).

Les stéroïdes synthétiques incluant la  $3\alpha,5\alpha$ -tétrahydroprogestérone ( $3\alpha,5\alpha$ -THP), la  $5\alpha$ -dihydroprogestérone ( $5\alpha$ -DHP), la prégnénolone (PREG), la progestérone (PROG), la  $17\alpha$ -hydroxyprogestérone ( $17OH$ PROG), la testostérone, la  $3\alpha$ -androstane-1,2-diol ( $3\alpha$ DIOL) et la  $17\beta$ -œstradiol proviennent de chez Steraloids (Newport, RI, USA). Le dichlorométhane (DCM) est fourni par Acros Organics (Noisy Le Grand, France). L'hexane et l'isopropanol ont été achetés chez Fisher Bioblock Scientific (Illkirch, France). Les stéroïdes tritiés tels que la  $9,11,12$ - $^3H$ (N)- $3\alpha,5\alpha$ -tétrahydroprogestérone ( $[^3H]3\alpha,5\alpha$ -THP), la  $1,2,6,7$ - $^3H$ (N)-progestérone ( $[^3H]$ PROG), la  $7$ - $^3H$ (N)-prégnénolone ( $[^3H]$ PREG), la  $1,2,6,7$ - $^3H$ (N)-testostérone ( $[^3H]$ T) et la  $9,11$ - $^3H$ (N)- $3\alpha$ -androstane-1,2-diol ( $[^3H]3\alpha$ DIOL) proviennent de chez PerkinElmer (Boston, MA, USA). La  $17\alpha$ -hydroxy-[ $1,2,6,7$ - $^3H$ ]-progestérone ( $[^3H]17OH$ PROG) est fournie par Amersham (Piscataway, NJ, USA).

## II. Culture cellulaire

Les neuroblastomes humains sont cultivés à  $37^\circ C$  en atmosphère saturée en humidité, sous 5% de  $CO_2$  dans du DMEM additionné de 10% (v/v) de sérum de veau fœtal, 5% (v/v) de sérum de cheval, 2 mM de glutamax et 1% (v/v) du mélange pénicilline/streptomycine. Certaines cellules SH-SY5Y ont été transfectées de façon stable à l'aide de lipofect

AMINEplus (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) par des constructions d'ADNc contenant la séquence codant l'APP humain ou avec le vecteur d'expression pCEP4 vide (Invitrogen) (Scheuermann et coll. 2001). Les cellules ainsi transfectées sont maintenues en culture dans le milieu décrit ci-dessus supplémenté par 300 µg/ml d'hygromycine.

D'autres cellules SH-SY5Y ont été transfectées de façon stable, soit par une forme longue de la protéine tau humaine contenant 4 séquences répétées (hTau40) soit par la forme mutée P301L de la protéine tau humaine soit par le vecteur d'expression pRc/RSV (Invitrogen) (Ferrari et coll. 2003). Ces cellules transfectées sont sélectionnées à l'aide de G418 (300 µg/ml de milieu).

### **III. Analyse microscopique de la morphologie des cellules SH-SY5Y**

Les cellules (non transfectées ou transfectées de façon stable avec les vecteurs vides ou contenant les protéines APP, hTau40 et P301L) ont étéensemencées à une densité de  $2,5 \cdot 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup> sur des lamelles en verre recouvertes avec 0,05 mg/ml de collagène. Après 24h en culture, les cellules sont observées au microscope DMR équipé d'une caméra digitale assistée par un ordinateur PC pentium IV (Leica, microsystems, Wetzlan, Allemagne).

### **IV. Etude de la viabilité des cellules SH-SY5Y : *MTT reduction assay***

#### **IV.1. Principe de la technique de MTT**

La technique de MTT est un test colorimétrique qui mesure la réduction du sel de tétrazolium (3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényl tetrazolium bromide) en formazan par

la succinate déshydrogénase présente dans les mitochondries des cellules vivantes. Le formazan forme des cristaux de couleur bleue. Ainsi, après solubilisation des cristaux, la mesure de l'absorbance à 595 nm permet d'obtenir des valeurs d'absorbance directement proportionnelles aux nombres de cellules viables.

## **IV.2. Protocole**

Les neuroblastomes sontensemencés à une densité de  $5 \times 10^4$  cellules par puits dans des plaques de 96 puits. Après 48h, les cellules sont incubées avec du milieu de culture en présence des substances testées.

### **IV.2.1. Etude de la survie cellulaire en présence de peptide $\beta$ -amyloïde**

Les cellules ont été incubées avec du milieu de culture (contrôles) ou exposées pendant 24h aux peptides  $\beta$ -amyloïdes pré-agrégés à différentes concentrations (100 nM, 500 nM, 1000 nM ou 12  $\mu$ M) dans le milieu de culture. Le MTT (10  $\mu$ l d'une solution stock de 3,6 mM) est ajouté dans chaque puits et l'incubation est poursuivie à l'obscurité pendant 5h à 37°C. Après la solubilisation des cristaux de formazan, des mesures au spectrophotomètre à 595 nm sont réalisées pour déterminer la viabilité cellulaire. Toutes les expériences ont été répétées quatre fois.

#### IV.2.2. Etude de la survie cellulaire en présence de peroxyde d'hydrogène

Les cellules ont été incubées avec du milieu de culture seul ou contenant de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  à diverses concentrations afin de déterminer les concentrations d' $\text{H}_2\text{O}_2$  et les temps d'incubation induisant la mort d'un pourcentage significatif de cellules.

Les propriétés neuroprotectrices de l'œstradiol ont été déterminées en prétraitant les cellules SH-SY5Y avec du milieu de culture seul ou contenant de l'œstradiol à 10 ou 100 nM. Après le prétraitement, chacune de ces catégories de cellules a été incubée pour 24h ou 48h avec les solutions suivantes : (i) milieu de culture (groupes  $\text{NT}_{24}$  and  $\text{NT}_{48}$ ) ; (ii) milieu de culture contenant uniquement de l'œstradiol à 10 nM (groupes  $[\text{E}_210]_{24}$  et  $[\text{E}_210]_{48}$ ) ou à 100 nM (groupes  $[\text{E}_2100]_{24}$  et  $[\text{E}_2100]_{48}$ ) ; (iii) milieu de culture contenant uniquement du  $\text{H}_2\text{O}_2$  à 1 mM (groupes  $[\text{H}_2\text{O}_2]_{24}$  et  $[\text{H}_2\text{O}_2]_{48}$ ) ; (iv) milieu de culture contenant à la fois du  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mM) et de l'œstradiol à 10 nM (groupes  $[\text{H}_2\text{O}_2+\text{E}_210]_{24}$  et  $[\text{H}_2\text{O}_2+\text{E}_210]_{48}$ ) ou à 100 nM (groupes  $[\text{H}_2\text{O}_2+\text{E}_2100]_{24}$  et  $[\text{H}_2\text{O}_2+\text{E}_2100]_{48}$ ).

Le MTT (10  $\mu\text{l}$  d'une solution stock de 3,6 mM) est ajouté dans chaque puits et l'incubation est poursuivie à l'obscurité pendant 5h à 37°C. Après la lyse cellulaire, des mesures au spectrophotomètre à 595 nm sont réalisées pour déterminer la survie cellulaire. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM de quatre expériences indépendantes. La significativité des résultats est déterminée par des analyses de la variance (ANOVA) suivies de comparaisons *post hoc* de Tukey.

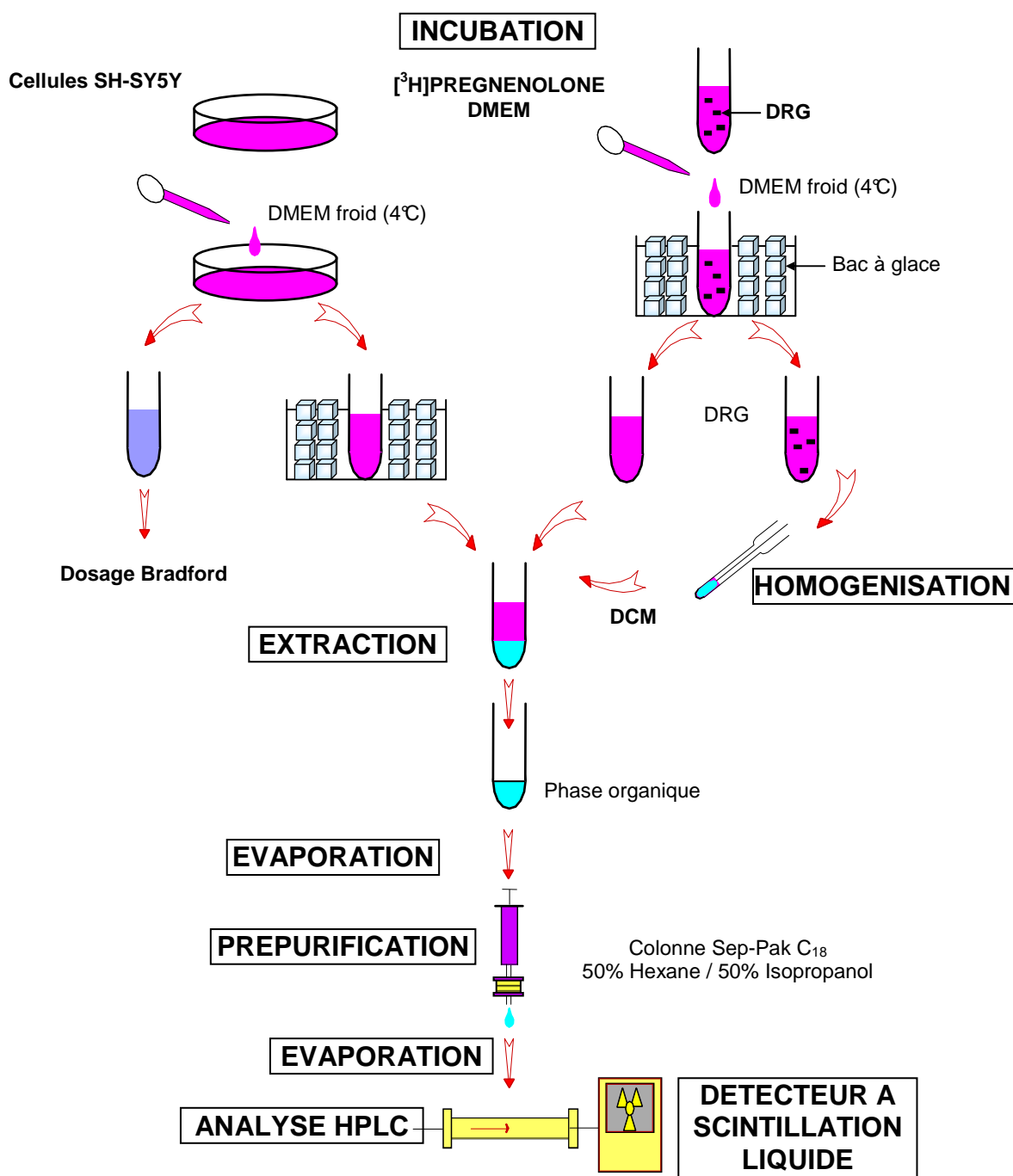
## **V. Etude de l'activité biologique des enzymes de synthèse des neurostéroïdes *in vitro* : conversion de la [<sup>3</sup>H]PREG en [<sup>3</sup>H]neurostéroïdes**

### **V.1. Incorporation de la prégnénolone tritiée dans les cellules SH-SY5Y (technique de pulse-chase, voir Figure 25)**

Pour ces expériences, les cellules SH-SY5Y confluentes sont incubées pendant 3h à 37°C avec 3 ml de milieu de culture (pH 7,4) contenant 240 nM de [<sup>3</sup>H]PREG stabilisée par 0,66% de propylène glycol. L'incubation se fait dans une atmosphère saturée en eau (95% air, 5% CO<sub>2</sub>) permettant de maintenir le pH à 7,4. A la fin de la période d'incubation, la réaction est arrêtée en ajoutant 1 ml de DMEM froid (4°C) dans les boîtes de culture. Le milieu d'incubation est ensuite transféré dans des tubes dont la moitié inférieure est immergée dans un bac à glace (4°C). Les neurostéroïdes néosynthétisés et sécrétés par les cellules dans le milieu d'incubation sont extraits trois fois par 2 ml de DCM. Les stéroïdes sulfatés très hydrophiles restent dans la phase aqueuse. La phase organique contenant les stéroïdes non conjugués est récupérée et évaporée sous vide dans un évaporateur rotatif (Speed-Vac, Jouan, St Herblain, France). L'extrait sec obtenu est repris par 2 ml d'une solution hexane (50%) / isopropanol (50%). L'échantillon obtenu est ensuite prépurifié sur colonne Sep-pak C<sub>18</sub> (Waters Associates, Milford, MA, USA) par 4 ml d'hexane (50%) / isopropanol (50%). L'extrait prépurifié est à nouveau évaporé au Speed Vac et conservé à -20°C avant l'analyse en chromatographie liquide haute performance (HPLC).

## **V.2. Caractérisation des neurostéroïdes néosynthétisés par le couplage HPLC-Flo/One**

Les neurostéroïdes néosynthétisés par les cellules SH-SY5Y à partir du précurseur [<sup>3</sup>H]PREG sont caractérisés en analysant les extraits prépurifiés sur colonne Sep-pak avec une méthode préalablement validée (Mensah-Nyagan et coll. 1994, 1996a, b, 2001a, b ; Patten-Mensah et coll. 2004a, 2005 ; Kibaly et coll. 2005 ; Saredi et coll. 2005). Cette méthode combine l'analyse HPLC en phase inverse avec la détection en flux continu des stéroïdes radioactifs en utilisant un détecteur à scintillation liquide (Radiomatic Flo-One/Beta A-500, Packard Instruments, Meriden, CT, USA). Le système HPLC utilisé est un chromatographe liquide Gilson (pompe 322, détecteur UV/VIS 156, Unipoint, Gilson, Middleton, WI, USA) équipé d'une colonne SymetryShield C<sub>18</sub> Waters (4,6 x 250 mm) qui est équilibrée avec de l'hexane pur. Les neurostéroïdes tritiés dérivés de la [<sup>3</sup>H]PREG sont élués sur la colonne à un débit de 0,5 ml/min en suivant un gradient d'isopropanol allant de 0 à 60% pendant 65 min avec 5 phases isocratiques respectivement à 0%, 1%, 2%, 30% et 60%. Les neurostéroïdes radioactifs néosynthétisés sont directement quantifiés à la sortie de la colonne HPLC par le système Flo/One équipé d'un ordinateur PC pentium IV permettant l'analyse simultanée des données. Des stéroïdes synthétiques standards utilisés comme référence ont été analysés dans les mêmes conditions que les extraits, et leur temps d'élution déterminé par le détecteur UV/VIS 156 intégré au système Gilson. De plus, la caractérisation des neurostéroïdes néosynthétisés a été optimisée en étalonnant le système HPLC-Flo/One avec des formes tritiées de neurostéroïdes ([<sup>3</sup>H]PROG, [<sup>3</sup>H]PREG, [<sup>3</sup>H]testostérone, [<sup>3</sup>H]3 $\alpha$ DIOL, [<sup>3</sup>H]17OHPROG et [<sup>3</sup>H]œstradiol).



**Figure 25 : Technique du pulse-chase.** Cette méthode biochimique permettant la mise en évidence de l'activité biologique d'une enzyme consiste en la mesure de métabolites radioactifs produits à partir d'un précurseur radioactif incorporé dans un tissu. Le pulse-chase comprend plusieurs étapes : (1) incorporation du précurseur radioactif, (2) homogénéisation du tissu, (3) extraction et (4) prépurification des extraits de stéroïdes radioactifs.



### V.3. Quantification de la biosynthèse des neurostéroïdes et analyse statistique

Les taux de neurostéroïdes radioactifs néoformés à partir de la conversion de la [<sup>3</sup>H]PREG sont exprimés en pourcentage de la radioactivité totale mesurée par le système HPLC-Flo/One (y compris la radioactivité détectée au niveau du pic correspondant à la [<sup>3</sup>H]PREG utilisée comme précurseur). Chaque neurostéroïde néosynthétisé est représenté par un pic et c'est l'aire mesurée sous ce pic qui est ensuite rapportée à la radioactivité totale (x100) pour déterminer le taux du neurostéroïde considéré. Les valeurs sont ensuite normalisées par la quantité de protéines contenue dans les boîtes de culture ayant servi pour les expériences de pulse-chase. La concentration en protéines a été déterminée par la technique de Bradford en utilisant le kit Bio-Rad Assay (Bio-Rad, München, Allemagne) et la BSA (*bovine serum albumine*) comme standard.

L'évaluation statistique des résultats est réalisée par une ANOVA à un ou deux facteurs suivie d'un test *post hoc* de Tukey.

## VI. Analyse de l'expression du gène codant l'aromatase par couplage

### Reverse Transcription - PCR quantitative en temps réel

#### VI.1. Principe général d'une PCR

La transcription inverse (*reverse transcription* ou RT) consiste à copier *in vitro* des ARN totaux, extraits des tissus étudiés, en ADN complémentaire (ADNc) grâce à l'action de l'enzyme transcriptase inverse. La réaction de polymérisation en chaîne (*Polymerase Chain Reaction* ou PCR) qui met en jeu une ADN polymérase, amplifie les molécules d'ADNc obtenues utilisées comme matrice. Un fragment de l'ADNc cible est multiplié en utilisant un

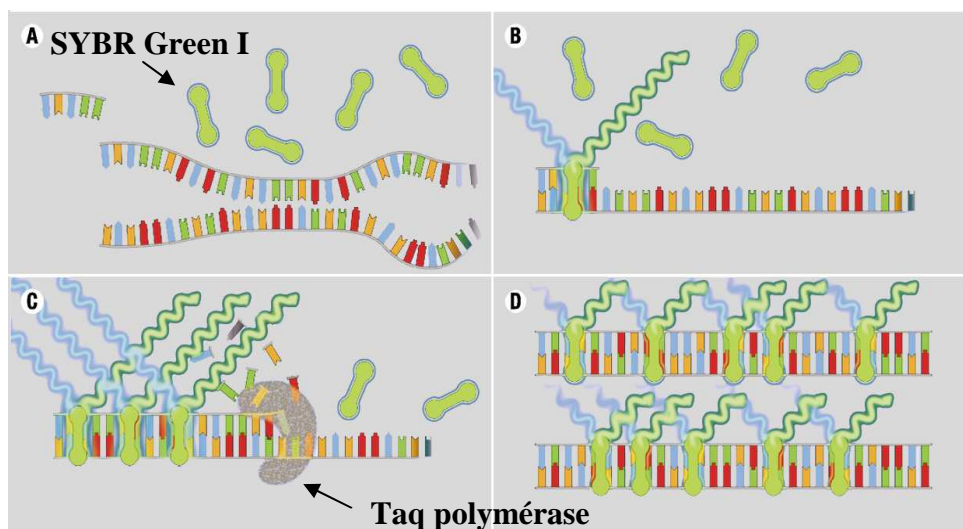
couple d'amorces spécifiques correspondant à la séquence d'ADN d'intérêt. Le principe de l'amplification *in vitro* repose sur la répétition de trois processus : (i) la dénaturation des deux brins de l'hybride ARN/ADNc, (ii) l'hybridation d'oligonucléotides spécifiques (amorces) complémentaires d'une séquence cible d'ADN à une température d'hybridation spécifique, et (iii) la réaction d'élongation par une ADN polymérase thermostable (*Taq polymerase*) à partir des oligonucléotides.

Afin de recueillir des données quantitatives avec précision, nous avons utilisé la technique de PCR quantitative en temps réel (rtPCR) qui présente de nombreux avantages par rapport à une PCR conventionnelle.

## **VI.2. Principe de la PCR quantitative en temps réel ou rtPCR**

Au cours d'une PCR conventionnelle, il existe une relation entre la quantité de la séquence cible de départ et la quantité de produits amplifiés à n'importe quel cycle. Mais en pratique, il n'est pas rare que les PCR donnent des taux différents d'amplicons. Le développement de la rtPCR quantitative a permis d'éliminer les variabilités traditionnelles associées à la PCR conventionnelle grâce à la quantification du produit de PCR de façon fiable et routinière. Cette technologie est basée sur la détection et la quantification d'un indicateur fluorescent (SYBR Green I) dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR (**Figure 26**). La rtPCR quantitative fait donc le suivi de la fluorescence émise pendant la réaction avec un indicateur de production des amplicons durant chaque cycle, à l'opposé de la PCR conventionnelle où les amplicons ne sont détectés qu'à la toute fin du processus. Etant donné que la rtPCR utilise des

systèmes en tubes fermés et que la quantification ne requiert aucune manipulation postérieure à l'amplification, les problèmes de contamination post-PCR sont significativement réduits.

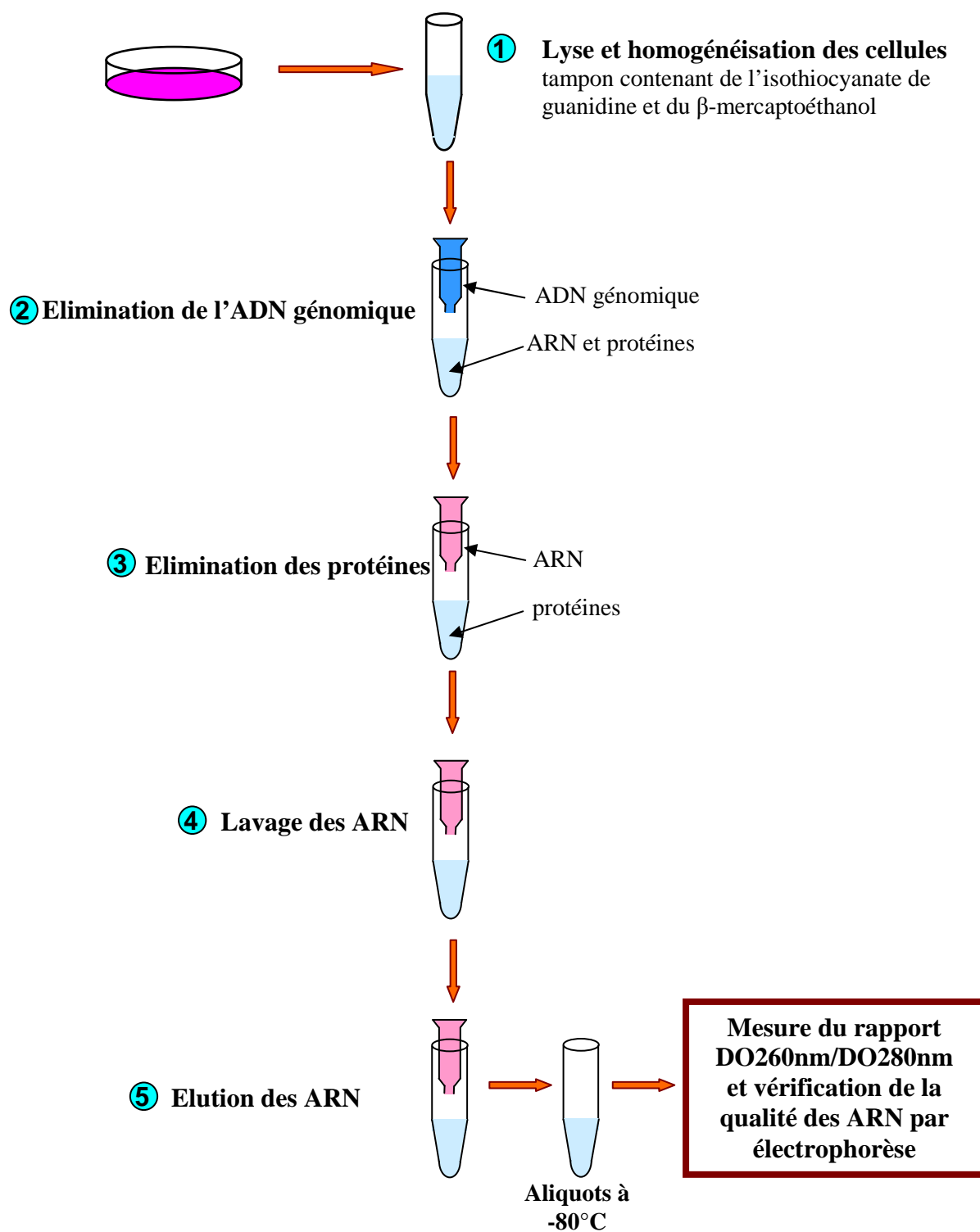


**Figure 26 : Mode d'action du SYBR Green I.** (A) Durant la phase de dénaturation, l'indicateur fluorescent SYBR Green I libre exhibe peu de fluorescence. (B) A la température d'hybridation, quelques molécules se lient au double brin d'ADN naissant, résultant en une émission de fluorescence lors de l'excitation. (C) Durant la phase de polymérisation effectuée par la Taq polymérase, de plus en plus de molécules de SYBR Green I se lient au double brin naissant et l'accroissement de la fluorescence peut être suivi en temps réel. (D) Le niveau de fluorescence est proportionnel au nombre de copies d'ADN obtenues.

### VI.3. Protocole

#### VI.3.1. Extraction des ARN et RT

L'extraction des ARN est réalisée à l'aide du kit RNeasy Plus (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les instructions du fabricant. Brièvement, le milieu de culture est aspiré et les cellules sont rincées à l'aide de PBS à 37°C. Les cellules sont ensuite lysées dans un tampon dénaturant fourni avec le kit d'extraction qui contient de l'isothiocyanate de guanidine (un dénaturant des protéines chaperonnes liées aux ARN) additionné de  $\beta$ -mercaptoéthanol. L'ensemble est homogénéisé par pipetages successifs. Puis, l'ADN génomique est éliminé et l'ARN est isolé grâce à l'utilisation de colonnes contenant une membrane en silice. Les ARN sont élués et dissous dans de l'eau stérile préalablement traitée au diéthylpyrocarbonate 0,1% (DEPC 0,1%) afin d'inactiver les RNases (**Figure 27**). Deux méthodes différentes ont permis de s'assurer de la qualité des ARN extraits des cellules SH-SY5Y. Une vérification de la qualité des ARN est faite par des expériences d'électrophorèse sur gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium. Cette vérification est complétée par des mesures de densité optique à deux longueurs d'onde d'absorption à savoir 260 nm et 280 nm. Les ARN sont de bonne qualité lorsque le rapport  $DO_{260\text{ nm}}/DO_{280\text{ nm}}$  est supérieur à 1,7. L'absorbance à 260 nm permet également de calculer la concentration des ARN contenus dans le culot. Sachant qu'une mesure de DO à 260 nm correspond à 40 ng/ $\mu$ l d'ARN totaux, la concentration en ng/ $\mu$ l est donnée par la formule :  $[ARN]_{\text{totaux}} = DO_{260\text{ nm}} \times 40$ . Les ARN sont stockés à -80°C jusqu'à la réalisation de la transcription inverse.

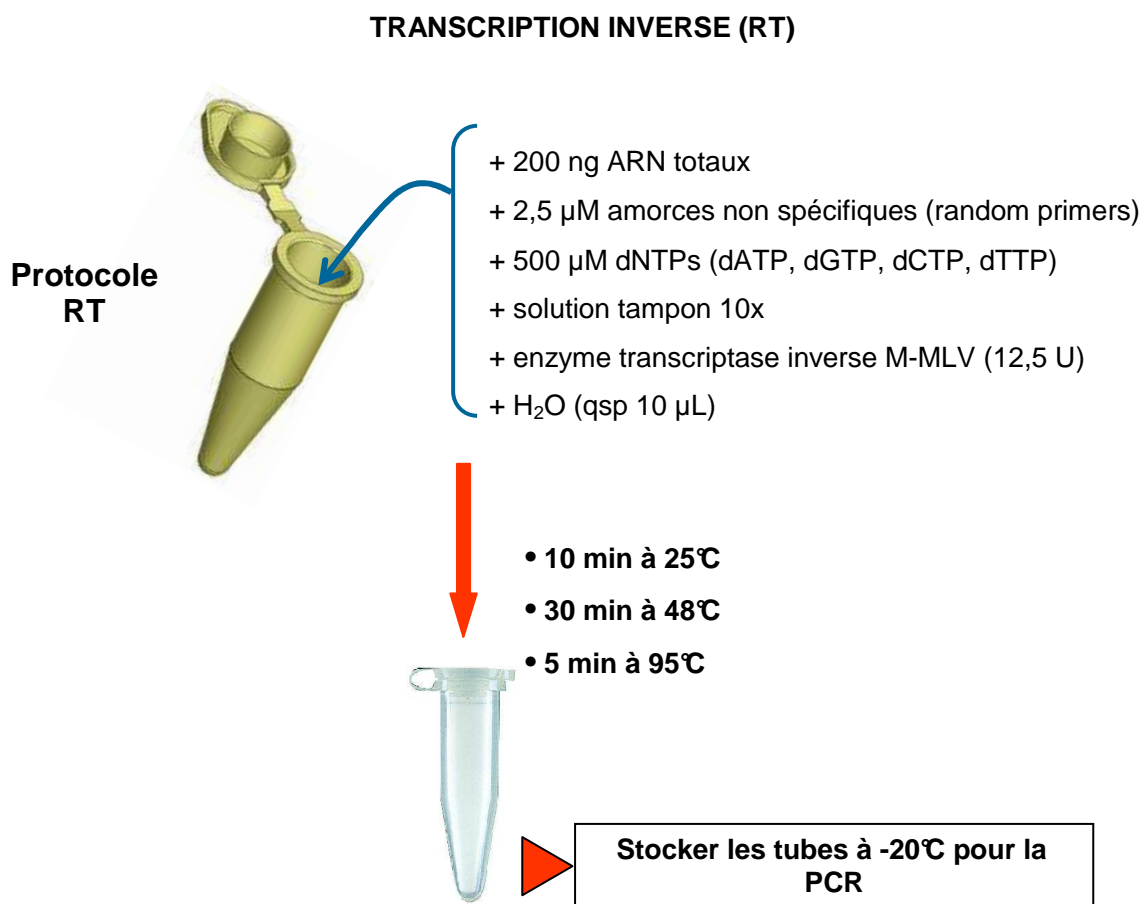


*Figure 27 : Extraction des ARN totaux des cellules SH-SY5Y. L'extraction des ARN totaux des cellules SH-SY5Y requiert plusieurs étapes dont (1) l'homogénéisation, (2) l'élimination de l'ADN génomique et (3) des protéines, (4) le lavage des ARN et (5) l'élution et la dissolution des ARN totaux.*

La synthèse d'ADNc (RT) est réalisée à partir de 200 ng d'ARN totaux à l'aide d'un kit (Reverse Transcriptase Core kit, Eurogentec, Seraing, Belgium) en présence de 2,5  $\mu$ M d'amorces non spécifiques (random nonamer), de 12,5 U de l'enzyme transcriptase inverse *Moloney murine leukaemia virus* (M-MLV) et de 500  $\mu$ M d'un mélange de déoxytrinucléotide phosphate (dNTPs : dATP, dGTP, dCTP et dTTP) dans un volume final de 10  $\mu$ l de solution tamponnée (Tableau 1). Le mélange réactionnel est incubé 10 min à 25°C, puis 30 min à 48°C et 5 min à 95°C. Les produits de transcription inverse sont stockés à -20°C jusqu'à la réalisation de la rtPCR (**Figure 28**).

Produits	Concentrations ou quantités finales
•ARN totaux	200 ng
•Amorces non spécifiques (random primer)	2,5 $\mu$ M
•Solution tamponnée 10x	1x
•dNTP	500 $\mu$ M
• Transcriptase inverse (M-MLV)	12,5 U
•Eau stérile	qsp 10 $\mu$ l

**Tableau 1** : Tableau récapitulatif des produits nécessaires à la transcription inverse.



**Figure 28 : Transcription inverse (RT) des ARN totaux en ADNc.**

La RT réalisée à partir de 200 ng d'ARN totaux nécessite la présence d'amorces non spécifiques, de l'enzyme transcriptase inverse M-MLV et des dNTPs, le tout mélangé dans une solution tamponnée.

### VI.3.2. PCR quantitative en temps réel

La rtPCR quantitative est réalisée à l'aide d'un Light Cyclers (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Allemagne) (**Figure 29**).



*Figure 29 : Photographie du Light Cyclers permettant la réalisation de la PCR quantitative en temps réel ou rtPCR (Roche Diagnostics).*

[www.labcentraal.com](http://www.labcentraal.com)

La sonde spécifique utilisée pour la rtPCR de l'aromatase humaine est la suivante :

- sens : 5'-TGC AGG AAA GTA CAT CGC CAT-3' (nucléotides 126-146)
  - antisens : 5'-TCC TTG CAA TGT CTT CAC GTG-3' (nucléotides 210-190)
- (Ishunina et coll., 2005).

La sonde spécifique du gène domestique, la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) est :

- Sens : 5' ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3' (nucléotides 3069-3088)
  - Antisens : 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3' (nucléotides 3624-3605)
- (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA).



La rtPCR est effectuée dans un volume final de 20 µl contenant : 40 ng d'ADNc, 100 nM de sondes spécifiques pour l'aromatase et 0,5 µM pour la GAPDH, 10 µl de tampon (QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix, Qiagen, Courtaboeuf, France) contenant du MgCl<sub>2</sub>, le SYBR Green I, la *Taq polymerase* et les dNTPs. Un contrôle négatif, appelé « eau » (« *water* » dans l'article), est réalisé en remplaçant, dans le volume réactionnel, la quantité prévue d'ADNc par de l'eau.

La rtPCR, contrairement à la PCR conventionnelle est une technique qui permet de quantifier avec précision le nombre d'amplicons formés. Pour cela, il est nécessaire de réaliser une gamme standard qui doit suivre plusieurs critères : (i) elle doit être réalisée dans un tissu différent de celui qui est étudié mais qui exprime fortement le gène d'intérêt. Pour cela, nous avons donc choisi les testicules, tissu riche en enzymes de la stéroïdogénèse et qui contient notamment l'aromatase (Lambard et Carreau 2005 ; Carreau et coll. 2006) ; (ii) la rtPCR doit être pratiquée dans les mêmes conditions et en même temps que les échantillons à doser pour que les courbes d'amplification ou de fusion soient obtenues lors du même programme d'amplification. La gamme standard est obtenue par dilutions successives de l'extrait contenant les ADNc synthétisés à partir des testicules. Le programme d'amplification consiste en une étape de dénaturation de 10 minutes à 95°C, suivie de plusieurs cycles d'amplification comprenant une étape de dénaturation (15 sec à 95°C) et une étape d'hybridation/élongation (1 min à 60°C). La spécificité des produits de rtPCR est vérifiée par une analyse des courbes de fusion obtenues à partir des températures de fusion qui caractérisent de manière spécifique chacun des gènes étudiés. Le niveau de transcrits codant l'aromatase et la GAPDH est déterminé à partir des valeurs de la gamme standard des testicules. Lors d'une PCR conventionnelle, les amplicons sont analysés sur gel d'agarose, à la fin de l'amplification, c'est-à-dire à un niveau où il y a peu ou pas de différence quantitative entre les échantillons. Contrairement à cela, la rtPCR quantitative analyse les amplicons au début de l'amplification

(point de sortie ou *crossing point*), là où la différence quantitative est la plus importante entre les échantillons. En effet, le point de sortie, défini comme le point d'intersection entre la tangente de la phase ascendante de l'amplification et la tangente de base de la phase initiale, est directement proportionnel au nombre de copies d'ADNc déjà présentes dans l'échantillon avant amplification. Plus le nombre de copies est important, plus le point de sortie se fera tôt dans le cycle. La gamme standard permet de définir une droite logarithmique représentant les valeurs des points de sortie de l'amplification du gène de l'enzyme d'intérêt dans les testicules, en fonction du logarithme du nombre de copies de ce même gène détectées au cours de la rtPCR. Les valeurs des points de sortie de nos échantillons d'intérêt sont alors placées sur la droite logarithmique, le nombre de copies de nos gènes d'intérêt peut être alors déterminé. Le taux d'ARN messagers (ARNm) de l'aromatase est calculé après normalisation des produits de rtPCR aromatase par rapport à la GAPDH.

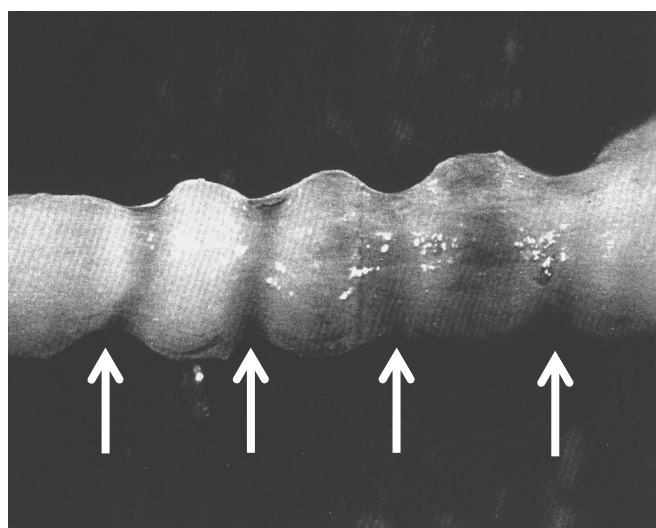
Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM de quatre expériences indépendantes. La significativité des résultats est déterminée en utilisant le test d'analyse de la variance (ANOVA) suivi des comparaisons *post hoc* de Tukey.

## **VII. Analyse comportementale de la sensibilité thermique et mécanique des rats témoins et neuropathiques**

### **VII.1. Animaux**

Dans notre étude, des rats mâles adultes Sprague-Dawley pesant 225-249 g ont été utilisés. Ils proviennent de la société commerciale Janvier (Le Genest-St-Isle, France). Ils sont soumis à des conditions standards de photopériode de 12h de jour / 12h de nuit avec de l'eau

et de la nourriture à volonté. Les opérations chirurgicales ont été réalisées sous anesthésie générale en utilisant un mélange de kétamine (75 mg/kg) / xylasine (5 mg/kg). La douleur neuropathique est induite selon le protocole décrit par Bennett et Xie (1988) et toutes les expériences ont été réalisées en adéquation avec les directives éthiques de l'IASP (Zimmermann 1983). Cette méthode consiste à poser 4 ligatures lâches espacées de 1 mm autour du nerf sciatique du rat provoquant ainsi une constriction du nerf qui induit le développement de symptômes tels que chez l'animal l'allodynie mécanique et l'hyperalgie thermique (**Figure 30** ; voir aussi dans l'introduction page 52). Les expériences ont été menées avec des rats non opérés (naïfs), des rats neuropathiques ou des rats pseudo-opérés (exposition du nerf sciatique droit ou gauche sans ligature). Le bon rétablissement des animaux après l'opération est contrôlé tous les jours ainsi que les paramètres indiquant la présence de la douleur neuropathique tels que la locomotion, la posture de la patte affectée et l'état des griffes (Bennett et Xie 1988). Les animaux sont euthanasiés à différents temps après la ligature (5, 10, 15, 20, 25, 30 jours) afin de réaliser les expériences biochimiques. Avant le sacrifice, des analyses comportementales ont été réalisées pour vérifier la présence ou l'absence des symptômes de douleur neuropathique tels que l'hyperalgie thermique et l'allodynie mécanique. Afin d'éviter les variations dues aux rythmes circadiens, les tissus sont toujours prélevés entre 9h30 et 11h30 et les études comportementales sont toutes réalisées dans les mêmes créneaux horaires.

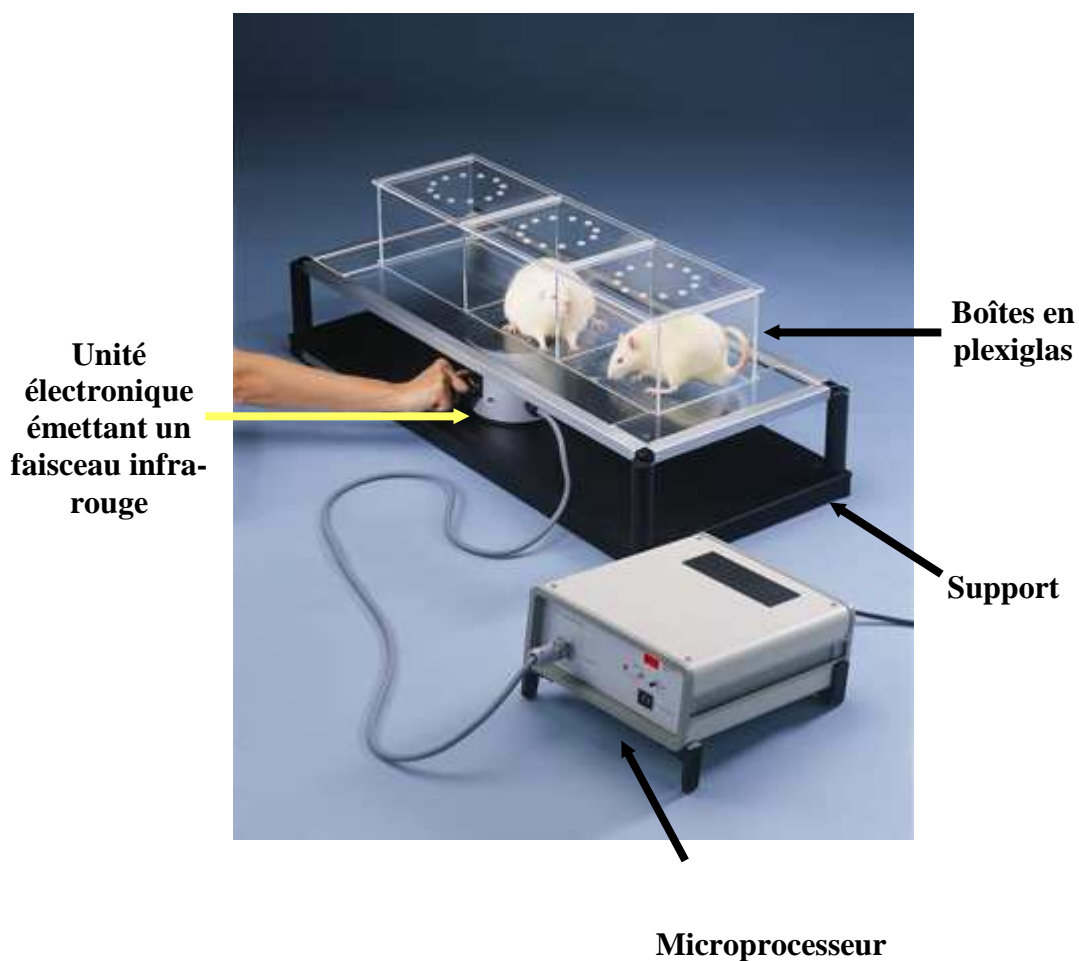


***Figure 30 : Photographie d'un nerf sciatique 10 jours après la ligature. Les 4 zones de constriction (flèches) correspondent à l'emplacement des 4 ligatures lâches effectuées sur le nerf. Bennett et Xie, 1988.***

## VII.2. Le test du Plantar

### Principe général du test

Le test du Plantar (Ugo Basile, Comerio, Italie) permet d'évaluer l'hyperalgie thermique, en mesurant la latence de retrait de la patte des animaux en réponse à une stimulation thermique chaude (Hargreaves et coll. 1988). Les rats sont placés individuellement dans des boîtes (23 x 18 x 14 cm) montées sur un support, l'ensemble étant en Plexiglas transparent. Une unité électronique, source du stimulus thermique chaud, est placée par l'expérimentateur sous la surface médiane plantaire de la patte postérieure de l'animal. Un faisceau infra-rouge émettant de la chaleur émane de l'unité électronique et traverse le support et la base de la boîte pour stimuler la patte. La latence de retrait de la patte est calculée de façon automatisée par un microprocesseur (**Figure 31**) : en effet, l'unité électronique est connectée à un chronomètre qui arrête automatiquement l'émission du faisceau infra-rouge lorsque le rat retire sa patte. La latence de retrait de la patte traduit le seuil de sensibilité au stimulus thermique utilisé. Lorsque l'intensité de la stimulation est suffisamment élevée pour être nocive, la latence de retrait de la patte traduit le seuil de sensibilité à la douleur. La limite du temps de la stimulation thermique est placée à 20 sec afin de prévenir tout dommage tissulaire en absence de réponse.



**Figure 31 : Photographie du dispositif expérimental permettant la mesure du seuil de sensibilité à la douleur thermique (test du Plantar).**

Le temps moyen de latence de retrait (en secondes) est déterminé pour chacune des pattes postérieures (ipsilatérale ou controlatérale chez les rats neuropathiques). Ce temps est calculé en faisant la moyenne de 3 mesures répétées sur la patte considérée, et ce à chaque point temporel étudié. La boîte de plexiglas est rigoureusement nettoyée entre chaque session de test.

### VII.3. Le test des filaments de von Frey

#### Principe général du test

Le seuil de sensibilité nociceptive mécanique est évalué chez des rats placés individuellement dans des boîtes en Plexiglas (30 x 30 x 25 cm) montées sur une grille de métal surélevée permettant ainsi d'accéder à la surface plantaire des pattes postérieures. La présence d'une allodynie mécanique est mesurée en utilisant une série de filaments de von Frey calibrés (4, 6, 8, 10, 26, 100, 180 et 300 g ; Stoelting, Wood Dale, IL, USA) qui sont appliqués à la surface plantaire de la patte postérieure de l'animal avec une force croissante jusqu'à ce que le filament se torde. Le filament est appliqué pendant une période de 1 à 2 s et la procédure est répétée 5 fois avec un intervalle de 4 à 5 s (**Figure 32**).

Le seuil de retrait de la patte considérée est calculé en faisant la moyenne des 5 stimuli répétés (en g) qui induisent un réflexe de retrait de la patte. Ainsi, à chaque point temporel, 5 mesures ont été obtenues pour chaque patte (un total de 10 mesures par animal).



*Figure 32 : Photographie du dispositif expérimental permettant la mesure du seuil de sensibilité à la douleur mécanique (Test des filaments de von Frey).*

#### **VII.4. Prétests et homogénéisation des groupes**

Avant tout traitement ou toute intervention chirurgicale, tous les animaux sont soumis à une période d'habituation à l'expérimentateur et à l'environnement du test, afin d'éviter le stress de la nouveauté. Après cette phase d'habituation, les seuils de sensibilité à la douleur thermique et mécanique sont mesurés chez tous les animaux. La répartition des animaux est ensuite réalisée sur la base de leur seuil initial à la douleur de sorte à reproduire exactement la même variabilité interindividuelle au sein de tous les groupes constitués.

#### **VII.5. Mesure de la sensibilité thermique et mécanique**

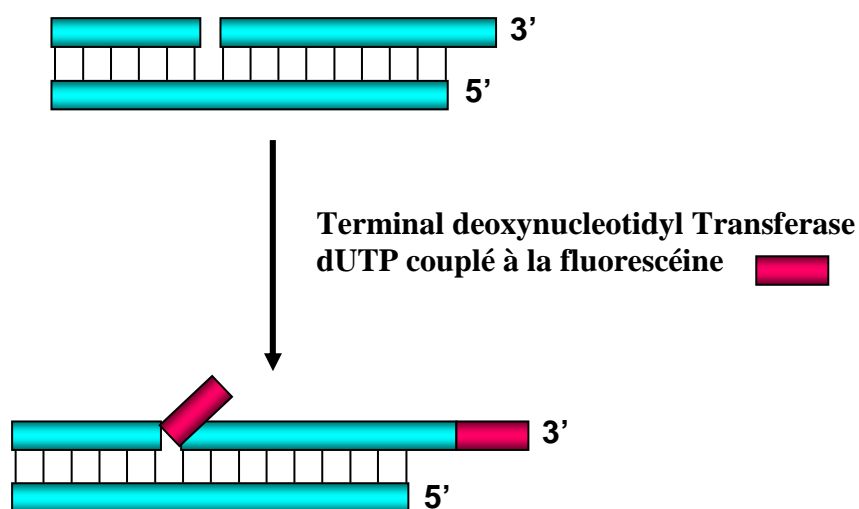
Les seuils de sensibilité à la douleur thermique et mécanique sont mesurés chez les animaux naïfs, pseudo-opérés et neuropathiques à 5 (D5), 10 (D10), 15 (D15), 20 (D20), 25 (D25) et 30 (D30) jours après la chirurgie.

### **VIII. Recherche de la présence d'apoptose dans les DRG et la moelle épinière par la technique de TUNEL**

#### **VIII.1. Principe de la technique de TUNEL**

Comme nous l'avons exposé dans le chapitre introductif, l'ADN génomique est clivé, au cours des processus apoptotiques, en fragments réguliers. Ces fragments d'ADN peuvent être identifiés par le marquage de leur extrémité 3'-OH libre. La technique de *terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labelling* ou TUNEL est basée sur une

réaction enzymatique catalysée par la *terminal deoxynucleotidyl transferase* (TdT) qui permet d'ajouter aux extrémités 3'-OH des désoxynucléotides marqués (**Figure 33**).



**Figure 33 : Principe du marquage TUNEL.** La *terminal deoxynucleotidyl transferase* (TdT) catalyse l'addition de dUTP couplés à la fluorescéine au niveau des extrémités 3'-OH des fragments d'ADN.

## VIII.2. Préparation des coupes

Les animaux sont anesthésiés par injection intrapéritonéale d'uréthane 25% (0,5 ml/100g) et perfusés par voie intracardiaque successivement avec 100 ml de tampon phosphate 0,1 M (PB ; pH 7,4) et 450 ml de solution de fixation (4% paraformaldéhyde dans du tampon phosphate). Les DRG et la moelle épinière sont ensuite prélevés et postfixés dans la même solution de fixation pendant 24h à 4°C. Après la période de postfixation, les échantillons sont transférés dans une solution de sucrose 15% puis dans du sucrose 30% pour une durée de 24h. Ils sont ensuite inclus dans une résine d'enrobage (Tissu-Tek, embedding medium, Industry Road, Hattfields, USA), puis conservés à -80°C. Les DRG et la moelle



épineière sont coupés en sections transversales fines de 10 µm avec un cryostat HM560 (MICROM International GmbH, Walldorf, Allemagne). Les coupes sont recueillies sur des lames prétraitées avec de la gélatine et de l'alun de chrome.

### **VIII.3. Protocole**

Les coupes de DRG et de moelle épineière sont rincées trois fois avec du PB (10 min/rinçage). Puis, les membranes sont perméabilisées pendant 5 min à l'aide d'une solution froide (4°C) de PB contenant 0,5% de triton X-100. Après trois rinçages au PB (10 min/rinçage) les coupes sont incubées avec la solution de TUNEL contenant la TdT et les nucléotides couplés à la fluorescéine (In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Roche, Mannheim, Allemagne) pendant 1h à 37°C et à l'obscurité. A la fin de la réaction enzymatique, les coupes subissent trois rinçages de 10 min avec du PB avant d'être montées dans du Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Les préparations sont examinées à l'aide d'un microscope à fluorescence équipé d'une caméra digitale assistée par un ordinateur PC pentium IV (Leica, microsystems).

La spécificité du marquage TUNEL est contrôlée grâce à l'incubation d'une série de coupes de DRG et de moelle épineière avec le réactif de TUNEL ne contenant pas la TdT.

## **IX. Etude *in vitro* de l'effet de l'apoptose sur la synthèse des neurostéroïdes dans les DRG**

Suite à l'identification de cellules apoptotiques dans les DRG ipsilatéraux des animaux neuropathiques 30 jours après la ligature du nerf sciatique, l'évaluation comparative de la neurostéroïdogenèse a été réalisée dans les DRG isolés de la région lombo-sacrée des rats

naïfs, pseudo-opérés et neuropathiques (côtés ipsilatéral et contralatéral). L'étude de la neurostéroïdogenèse a été effectuée à D30 après la chirurgie en utilisant l'approche combinant l'HPLC et le Flo/One (voir description dans le chapitre V, pages 85 à 88).

## **RESULTATS**

## **I. Modulation de la biosynthèse des neurostéroïdes dans les neuroblastomes humains par des protéines clés de la maladie d'Alzheimer**

Sont présentés dans ce premier chapitre, les résultats fournis par notre étude ayant recherché les effets de la transfection de protéines clés impliquées dans la maladie d'Alzheimer sur la biosynthèse des neurostéroïdes dans les neuroblastomes humains SH-SY5Y. Il est vrai que des études réalisées chez l'animal suggèrent l'implication des neurostéroïdes dans la neuroprotection (voir introduction générale, pages 70 à 73). Néanmoins, le rôle direct de la neurostéroïdogenèse ou des neurostéroïdes endogènes dans la régulation des mécanismes neurodégénératifs n'a jamais été déterminé chez l'humain. La pathologie neurodégénérative la plus fréquente observée dans l'espèce humaine est la maladie d'Alzheimer caractérisée par des dépôts extracellulaires de peptides  $\beta$ -amyloïde ( $A\beta$ ) ou plaques amyloïdes ainsi que des agrégats intracellulaires de protéine tau hyperphosphorylée qui induisent une importante mort neuronale dans le cerveau des patients. Afin de déterminer si les facteurs pro-neurodégénératifs interfèrent avec la neurostéroïdogenèse chez l'humain, nous avons étudié les effets de la surexpression de protéines clés (tau normale ou native, tau mutée P301L, *Amyloid  $\beta$  precursor protein* ou APP) intervenant dans la maladie d'Alzheimer sur la production de neurostéroïdes dans les neuroblastomes humains SH-SY5Y. Cette lignée de cellules qui possède de nombreuses propriétés neuronales est considérée comme le modèle cellulaire le plus représentatif pour l'étude des mécanismes biochimiques et moléculaires caractéristiques de la maladie d'Alzheimer (Tanaka et coll. 1995 ; Li et coll. 1996 ; Mailliot et coll. 1998 ; Zhong et coll. 1999 ; Misonou et coll. 2000 ; Wang et coll. 2001a ; Olivieri et coll. 2002 ; Ferrari et coll. 2003 ; Jämsä et coll. 2004). En plus, les cellules SH-SY5Y ont également été identifiées comme étant des cellules productrices de neurostéroïdes qui

contiennent diverses enzymes clés de synthèse des stéroïdes (Melcangi et coll. 1993 ; Wozniak et coll. 1998 ; Guarneri et coll. 2000).

### **I.1. Analyses morphologiques**

Des analyses microscopiques nous ont permis de vérifier si les transfections avec des protéines clés de la maladie d'Alzheimer induisent ou non des modifications dans la morphologie des neuroblastomes SH-SY5Y. Les études microscopiques ont révélé que les cellules SH-SY5Y normales (non transfectées), les cellules transfectées avec le vecteur vide ou avec le vecteur contenant les séquences nucléotidiques codant les protéines APP, hTau40 et P301L possèdent toutes une morphologie typique de neuroblastome caractérisée par un corps cellulaire bien différencié émettant de courts prolongements ou neurites. Aucune différence significative n'a été détectée entre ces diverses catégories de cellules SH-SY5Y normales ou transfectées, ce qui démontre que la surexpression des protéines clés impliquées dans la maladie d'Alzheimer n'altère pas la morphologie des neuroblastomes humains.

### **I.2. Neurostéroïdogenèse dans les cellules SH-SY5Y**

Grâce à la combinaison des expériences de pulse-chase avec des analyses HPLC et Flo/One, nous avons constaté que, contrairement à leur aspect morphologique qui reste inchangé, l'activité biochimique responsable de la biosynthèse des neurostéroïdes dans les cellules SH-SY5Y a complètement été perturbée par la transfection des protéines prodégénératives de la maladie d'Alzheimer. Les évaluations analytiques en HPLC et au Flo/One ayant suivi les expériences de pulse-chase ont d'abord révélé que toutes les catégories de neuroblastomes SH-SY5Y utilisées dans notre étude sont capables de convertir la

prégnénolone tritiée ou [ $^3\text{H}$ ]PREG (précurseur de toutes les classes de stéroïdes) en divers neurostéroïdes tritiés tels que la [ $^3\text{H}$ ]progestérone, la [ $^3\text{H}$ ]3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP, la [ $^3\text{H}$ ]17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone, la [ $^3\text{H}$ ]testostérone, la [ $^3\text{H}$ ]3 $\alpha$ -androstenediol et la [ $^3\text{H}$ ]œstradiol. Les analyses quantitatives et statistiques ont révélé que la surexpression de la protéine Tau native hTau40 stimule fortement la neurostéroïdogénèse en augmentant significativement la synthèse de [ $^3\text{H}$ ]progestérone, [ $^3\text{H}$ ]17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone, [ $^3\text{H}$ ]testostérone et [ $^3\text{H}$ ]3 $\alpha$ -androstenediol à partir de la [ $^3\text{H}$ ]PREG. La puissante action stimulatrice induite par hTau40 sur la neurostéroïdogénèse disparaît totalement lorsqu'intervient une mutation sur la protéine Tau car aucun effet significatif n'a été observé sur la biosynthèse des neurostéroïdes dans les neuroblastomes humains transfectés par la protéine Tau mutée P301L.

L'effet de la surexpression de la protéine APP varie en fonction du neurostéroïde considéré : la transfection d'APP, qui inhibe la conversion de [ $^3\text{H}$ ]PREG en [ $^3\text{H}$ ]progestérone, n'affecte pas la production de [ $^3\text{H}$ ]17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone mais stimule la biosynthèse de [ $^3\text{H}$ ]3 $\alpha$ -androstenediol et de [ $^3\text{H}$ ]œstradiol dans les neuroblastomes. Il est possible que la modification de la neurostéroïdogénèse observée dans les cellules transfectées par l'APP soit directement induite par l'APP lui-même ou plutôt par des peptides  $\beta$ -amyloïdes générés à partir de l'APP. Pour clarifier ce point, nous avons étudié la biosynthèse des neurostéroïdes dans les cellules surexprimant l'APP en présence du DAPT, un inhibiteur de la  $\gamma$ -secrétase (enzyme convertissant l'APP en peptides  $\beta$ -amyloïdes). En présence de DAPT, alors que la production de [ $^3\text{H}$ ]progestérone, [ $^3\text{H}$ ]3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP et [ $^3\text{H}$ ]17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone est stimulée dans les cellules transfectées à l'APP, la biosynthèse de [ $^3\text{H}$ ]œstradiol n'est pas affectée. Ces données suggèrent qu'en absence de DAPT, les modifications de la neurostéroïdogénèse que nous avons observées dans les cellules SH-SY5Y transfectées à l'APP (inhibition de la conversion de [ $^3\text{H}$ ]PREG en [ $^3\text{H}$ ]progestérone, stimulation de la biosynthèse de [ $^3\text{H}$ ]3 $\alpha$ -

androstanediol et de [ $^3\text{H}$ ]œstradiol) ne dépendent pas directement de l'APP lui-même mais des peptides  $\beta$ -amyloïdes générés à partir de l'APP dans le milieu intracellulaire.

**L'ensemble des résultats obtenus sur l'axe de recherche évoqué ci-dessus a fait l'objet d'un article publié dans Journal of Neurobiology. Les figures et illustrations relatives aux résultats décrits se trouvent dans l'exemplaire de l'article joint au mémoire qui permet également d'apporter des informations complémentaires et détaillées sur les résultats.**

# Modulation of Neurosteroid Production in Human Neuroblastoma Cells by Alzheimer's Disease Key Proteins

Véronique Schaeffer,<sup>1</sup> Christine Patte-Mensah,<sup>1</sup> Anne Eckert,<sup>2</sup>  
 Ayikoe G. Mensah-Nyagan<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Centre National de la Recherche Scientifique/Université Louis Pasteur, 21 rue René Descartes, 67084 Strasbourg Cedex, France

<sup>2</sup> Neurobiology Research Laboratory, Psychiatric University Clinic, Wilhelm Klein-Strasse 27, CH-4025 Basel, Switzerland

Received 15 December 2005; accepted 16 January 2006

**ABSTRACT:** Studies performed with animals suggest neurosteroid involvement in neuroprotection. However in humans, the role of neurosteroidogenesis in the regulation of degenerative processes is unknown. To determine whether cellular factors intervening in degenerative mechanisms may interfere with the process of neurosteroidogenesis in humans, we combined pulse-chase experiments with HPLC and continuous flow scintillation detection to compare neurosteroid production in normal and transfected SH-SY5Y cells with key proteins involved in Alzheimer's disease (AD). Microscope analyses revealed that cell morphology was unchanged in stably transfected SH-SY5Y cells overexpressing human native tau (hTau40), mutant tau (P301L), and wild-type amyloid precursor protein (APPwt) compared to controls. Biochemical investigations showed that hTau40 enhanced progesterone (PROG), 17OHPROG, testosterone, and 3 $\alpha$ -androstenediol neosynthesis from pregnenolone. In contrast, tau with the pathogenic

P301L mutation was devoid of action on neurosteroidogenesis. Overexpression of APPwt inhibited PROG formation, did not affect 17OHPROG and testosterone, but increased 3 $\alpha$ -androstenediol and estradiol synthesis. Extracellular treatment of control cells with aggregated amyloid peptide mimicked the action of APPwt expression on PROG but not on 3 $\alpha$ -androstenediol and estradiol production. Moreover, PROG biosynthesis in APPwt cells was up-regulated in the presence of a  $\gamma$ -secretase inhibitor. Our results provide the first evidence for the regulation of neurosteroid biosynthesis by key proteins involved in the etiology of AD. The data suggest that pathogenic factors may induce neurodegeneration in humans through the reduction of the synthesis of endogenous neuroprotective neurosteroids in nerve cells. © 2006 Wiley Periodicals, Inc. *J Neurobiol* 66: 868–881, 2006

**Keywords:** Alzheimer's disease; human neuroblastoma; neurodegeneration; neuroprotection; neuroactive steroid

Correspondence to: A.G. Mensah-Nyagan (gmensah@neurochem.u-strasbg.fr).

Contract grant sponsor: Conseil Régional d'Alsace.

Contract grant sponsor: Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, France).

Contract grant sponsor: Université Louis Pasteur (Strasbourg, France).

Contract grant sponsor: Neuroscience Upper Rhine Network Neurex (Strasbourg, France; Basel, Switzerland; Freiburg, Germany).

© 2006 Wiley Periodicals, Inc.

Published online 3 May 2006 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI 10.1002/neu.20267

## INTRODUCTION

Neurons and glial cells are capable of synthesizing various bioactive steroids also called neurosteroids (Baulieu et al., 1999; Mensah-Nyagan et al., 1999; Mellon and Griffin, 2002). The process of neurosteroid biosynthesis has been evidenced in the nervous system of several animal species and in humans, indicating that this process, which is well conserved through the vertebrate phylum, may control important



neurophysiological functions (Mensah-Nyagan et al., 1999, 2001a,b; Tsutsui et al., 2000; Stoffel-Wagner, 2001; Schumacher et al., 2003). Pharmacological and behavioral studies have suggested that neurosteroids participate in the regulation of neurobiological mechanisms such as stress (Purdy et al., 1991; Patchev et al., 1996; Zimmerberg and Brown, 1998), anxiety (Majewska, 1992; Brot et al., 1997; Hodge et al., 2002), cognition (Mayo et al., 1993; Vallée et al., 1997, 2001), and neuroprotection (Guth et al., 1994; Kimonides et al., 1998; Frank and Sagratella, 2000). In particular, several investigations using rodents as models revealed that within the nervous system, synthesis of progesterone (PROG) and its active metabolites, dihydroprogesterone ( $5\alpha$ -DHP) and tetrahydroprogesterone ( $3\alpha,5\alpha$ ,THP), contributes to the protection of nerve cells against degeneration (Koenig et al., 1995; Ghomari et al., 2003; Martini et al., 2003; Melcangi et al., 2003; Schumacher et al., 2004). Moreover, it has been demonstrated that neurosteroids control reactive gliosis in rat brain (Garcia-Estrada et al., 1999; Hoyk et al., 2004) and rescue motor neurons from death in the wobbler mice (Gonzalez Deniselle et al., 2002; Schumacher et al., 2004). However, in humans, the role of neurosteroidogenesis in the regulation of degenerative mechanisms is almost completely unknown and this situation hampers the development of neuroprotective therapies based on neurosteroid exploitation. Recently, high levels of proteins involved in the formation of plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease (AD) were correlated with decreased cerebral concentrations of neurosteroids such as pregnenolone sulfate (PREGS) and dehydroepiandrosterone sulfate or DHEAS (Weill-Engerer et al., 2002; Kim et al., 2003). In AD and various other human neurodegenerative diseases, the main pathologic components of neurofibrillary tangles are paired helical filaments of highly phosphorylated microtubule-associated protein tau (Grundke-Iqbal et al., 1986; Kosik et al., 1986; Buée et al., 2000; Iqbal et al., 2005). Unlike normal tau, which maintains microtubule structure, hyperphosphorylated tau sequesters proteins associated to microtubules and provokes destabilization of neuronal cytoskeleton leading to neurodegeneration (Alonso et al., 1997). The common tau missense mutation associated with neurodegenerative disorders in humans is Pro<sup>301</sup>-to-Leu (P301L tau), which leads to intracellular neurofibrillary lesions composed of hyperphosphorylated tau in frontotemporal dementia with Parkinsonism linked to chromosome 17 (Hutton et al., 1998; Poorkaj et al., 1998; Spillantini et al., 1998). AD is also characterized by an amyloidogenic pathway leading to the formation of  $\beta$ -amyloid plaques,

which constitute, with neurofibrillary tangles, the pivotal lesions. Although progress has been made over the past years regarding the involvement of the amyloid precursor protein (APP) in AD, the biological activity of this protein remains a matter of speculation (Mattson, 1997; Bayer et al., 1999; Coulson et al., 2000; Heber et al., 2000; Neve et al., 2000). It was demonstrated that APP binds to the brain-specific signal-transducing Go protein and APP mutants of familial AD can induce Go-mediated apoptosis in neurons (Nishimoto et al., 1993; Yamatsuji et al., 1996; Neve et al., 2000).

In order to determine whether key proteins involved in the modulation of neurodegenerative processes may interfere with neurosteroidogenesis in humans, we investigated the effects of the wild-type APP (APPwt), aggregated  $\beta$ -amyloid peptide ( $A\beta_{25-35}$ ), the wild-type tau (hTau40), and mutant P301L tau on neurosteroid production in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. This cell line, which is considered as the most representative cellular model for investigations on AD (Tanaka et al., 1995; Li et al., 1996; Mailliot et al., 1998; Zhong et al., 1999; Misonou et al., 2000; Wang et al., 2001; Olivieri et al., 2002; Ferrari et al., 2003; Jäämä et al., 2004) was also characterized as a neurosteroid-producing cell line containing various key steroid-synthesizing enzymes (Melcangi et al., 1993; Wozniak et al., 1998; Guarneri et al., 2000). Therefore, we have used the well-validated approach combining pulse-chase experiments, high-performance liquid chromatography (HPLC), and continuous flow scintillation detection (Mensah-Nyagan et al., 1994, 1996a,b; Patte-Mensah et al., 2003, 2004, 2005; Kibaly et al., 2005) to investigate neurosteroid synthesis in SH-SY5Y native cells compared to cells stably transfected with hTau40, P301L, APPwt, or control vectors. The effects of aggregated synthetic  $A\beta_{25-35}$  peptide and DAPT (a selective inhibitor of  $\gamma$ -secretase, which catalyzes APP conversion into  $A\beta$ ) on neurosteroid production were also studied.

## METHODS

### Chemicals and Reagents

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Glutamax, and penicillin/streptomycin were purchased from Sigma (St Louis, MO). Fetal calf serum, horse serum, G418, and hygromycin were from Gibco (Basel, Switzerland). DAPT (*N*-[*N*-(3,5-difluorophenyl)-L-alanyl]-L-serine *t*-butyl ester) was obtained from Merck Biosciences (Darmstadt, Germany).  $A\beta_{25-35}$  was from Bachem AG (Bubendorf, Switzerland). Synthetic steroids including PROG, pregnenolone (PREG),  $3\alpha,5\alpha$ ,THP,  $17\alpha$ -hydroxyprogesterone (17OHPROG), testosterone (T),  $3\alpha$ -androstenediol ( $3\alpha$ DIOL), and  $17\beta$ -estradiol were purchased from Steraloids (Newport, RI). Dichlorome-

thane (DCM) was from Acros Organics (Noisy Le Grand, France). Hexane and isopropanol were obtained from Fischer BioBlock Scientific (Illkirch, France). Propylene glycol was supplied by Sigma. Tritiated steroids such as 7-<sup>3</sup>H(N)-pregnenolone ([<sup>3</sup>H]PREG), 1,2,6,7-<sup>3</sup>H(N)-progesterone ([<sup>3</sup>H]PROG), 9,11,12-<sup>3</sup>H(N)-3 $\alpha$ ,5 $\alpha$  tetrahydroprogesterone ([<sup>3</sup>H]3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,THP), 1,2,6,7-<sup>3</sup>H(N)-testosterone ([<sup>3</sup>H]T), and 9,11-<sup>3</sup>H(N)-3 $\alpha$ -androstenediol ([<sup>3</sup>H]3 $\alpha$ DIOL) were obtained from Perkin-Elmer (Boston, MA). 17 $\alpha$ -Hydroxy-[1,2,6,7-<sup>3</sup>H]-progesterone ([<sup>3</sup>H]17OHPROG) was purchased from Amersham (Piscataway, NJ).

### Cell Culture, Transfection, and Microscope Analyses

Human neuroblastoma SH-SY5Y cells were grown at 37°C under an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in DMEM supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum, 5% (v/v) heat-inactivated horse serum, 2 mM Glutamax, and 1% (v/v) penicillin/streptomycin. SH-SY5Y cells were stably transfected with DNA constructs harboring human wild-type APP (APPwt) or the expression vector pCEP4 (Invitrogen, Europe) alone (control vector) using lipofect AMINEplus (Invitrogen) (Scheuermann et al., 2001). Transfected APPwt cells were grown in DMEM standard medium supplemented with 300  $\mu$ g/mL hygromycin.

SH-SY5Y cells were also stably transfected with either the longest four-repeat isoform of hTau40 or mutant P301L human tau cDNA constructs or empty vector (pRc/RSV; Invitrogen) using lipofect AMINE2000 (Invitrogen) (Ferrari et al., 2003). These cells were grown in DMEM standard medium supplemented with 300  $\mu$ g/mL G418.

In all experiments, stably transfected SH-SY5Y cells were compared to the corresponding empty or control vector used. Cells were passaged every 3–4 days and were used for pulse-chase experiments when they reached 80–90% confluence.

For the morphological analysis, cells were seeded at a density of  $2.5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> on coverslips previously coated with 0.05 mg/mL collagen and examined under a DMR microscope equipped with a digital camera assisted by a Pentium IV PC computer (Leica, Wetzlar, Germany).

### Pulse-Chase Experiments

For each experiment, the confluent cells were incubated at 37°C for 3 h with 3 mL of culture medium containing 240 nM [<sup>3</sup>H]PREG supplemented with 0.66% propylene glycol in the presence or absence of test substances. In the study of  $\gamma$ -secretase inhibition, the cells were pretreated with 1  $\mu$ M DAPT (the  $\gamma$ -secretase selective inhibitor) 3 consecutive days before the onset of pulse-chase experiments. The same concentration of DAPT was maintained in the culture medium during the incubation time with [<sup>3</sup>H]PREG. For the experiments with exogenous A $\beta$ , SH-SY5Y cells were pretreated with 100 nM, 500 nM, or 1  $\mu$ M aggregated A $\beta$ <sub>25–35</sub> during 24 h and the peptide was also kept in the medium during the incubation with the radioactive steroid precursor. In all series of experiments, the incubation was made in a water-saturated atmosphere

(95% air, 5% CO<sub>2</sub>), which made it possible to maintain the pH at 7.4. At the end of the incubation period, the reaction was stopped by adding 1 mL of ice-cold DMEM and transferring the incubation medium in tubes into a cold water bath (0°C). Newly synthesized neurosteroids released by the cells were extracted from the incubation medium three times with 2 mL of DCM and the organic phase was evaporated on ice under a stream of nitrogen. The dry extracts were redissolved in 2 mL of hexane and prepurified on Sep-Pak C<sub>18</sub> cartridges (Waters Associates, Milford, MA). Steroids were eluted with a solution made of 50% isopropanol and 50% hexane. The solvent was evaporated in a RC-10-10 Speed Vac Concentrator and the dry extracts were kept at –20°C until HPLC analysis. The extraction efficiency was  $89 \pm 7\%$ .

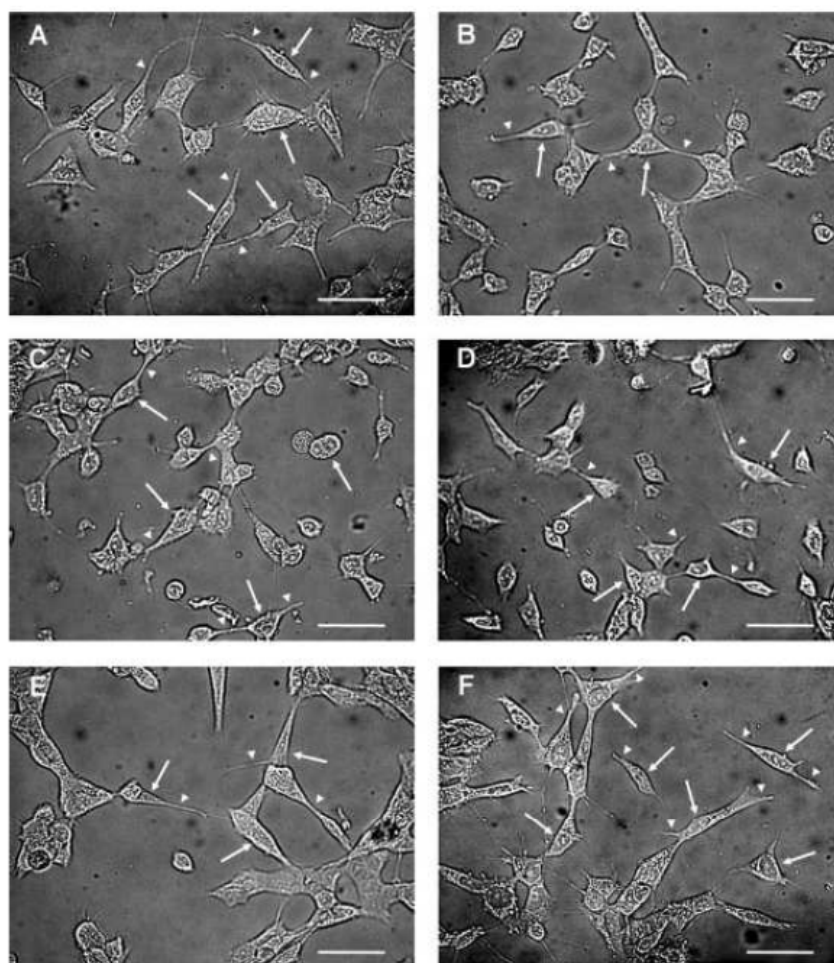
### HPLC-Flo/One Characterization of Steroids

The newly synthesized steroids extracted from the incubation medium already purified on Sep-Pak cartridges were characterized using a previously validated method, which combines HPLC analysis and flow scintillation detection (Mensah-Nyagan et al., 1994, 1996a,b; Patte-Mensah et al., 2003, 2004, 2005; Kibaly et al., 2005). Briefly, the prepurified extracts were analyzed by reversed-phase HPLC on a Gilson liquid chromatograph (322 pump, UV/VIS 156 detector, Unipoint system; Gilson, Middleton, WI) equipped with a 4.6  $\times$  250 mm SymetryShield C<sub>18</sub> column (Waters Associates) equilibrated with 100% hexane. The radioactive steroids were eluted at a flow rate of 0.5 mL/min using a gradient of isopropanol (0–60% over 65 min) including five isocratic steps at 0% (0–10 min), 1% (30–35 min), 2% (40–45 min), 30% (50–55 min), and 60% (60–65 min). The tritiated steroids eluted from the HPLC column were directly quantified with a flow scintillation analyzer (Radiomatic Flo/One-Beta A 500; Packard Instruments, Meriden, CT) equipped with a Pentium IV PC computer for measurement of the percentage of total radioactivity contained in each peak. Synthetic steroids used as reference standards were chromatographed under the same conditions as the extracts obtained from the cell incubation media, and their elution positions were determined by ultraviolet absorption using a UV/VIS 156 detector (Gilson).

To optimize the characterization of newly synthesized neurosteroids, synthetic tritiated neuroactive steroids including [<sup>3</sup>H]PREG, [<sup>3</sup>H]PROG, [<sup>3</sup>H]3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,THP, [<sup>3</sup>H]17OHPROG, [<sup>3</sup>H]T, and [<sup>3</sup>H]3 $\alpha$ DIOL were also used as reference standards, chromatographed under the same conditions as the extracts and identified by their elution times with the Flo/One computer system.

### Quantification of Steroid Biosynthesis and Statistical Analysis

In a first step, the amount of radioactive steroids formed by the conversion of [<sup>3</sup>H]PREG was calculated as a percentage of the total radioactivity contained in all peaks resolved by the HPLC-Flo/One system, including [<sup>3</sup>H]PREG itself. Afterwards, the final amount or value used for the chartbars was



**Figure 1** Morphological analysis of native and transfected SH-SY5Y cells. (A) Native SH-SY5Y cells exhibited a neuroblast-like morphology with differentiated perykaria (arrows) and occasional short neurites (arrowheads). (B–D) Transfection of SH-SY5Y cells with the empty pRc/RSV vector (B) or with the vector containing cDNA encoding hTau40 (C) or mutant P301L tau (D) did not significantly change the general morphological aspect of the cells. (E,F) Photomicrographs of SH-SY5Y cells transfected with pCEP4 vector alone (E) or harboring APPwt cDNA (F). These cells also exhibited a similar morphology to that of native SH-SY5Y cells (A). Scale bars = 50  $\mu$ m.

determined after normalization to the quantity of proteins contained in the dish of confluent cells, which served for the pulse-chase experiment. The protein concentration was determined using a Bio-Rad Protein Assay kit (Bio-Rad, München, Germany) and bovine serum albumin as standard. Each value is the mean of four independent experiments. Statistical analysis was performed with the 5.1 version of Statistica software (Statsoft, Maison Alfort, France). One- or two-way ANOVAs, followed by Tukey posthoc comparisons, were used.

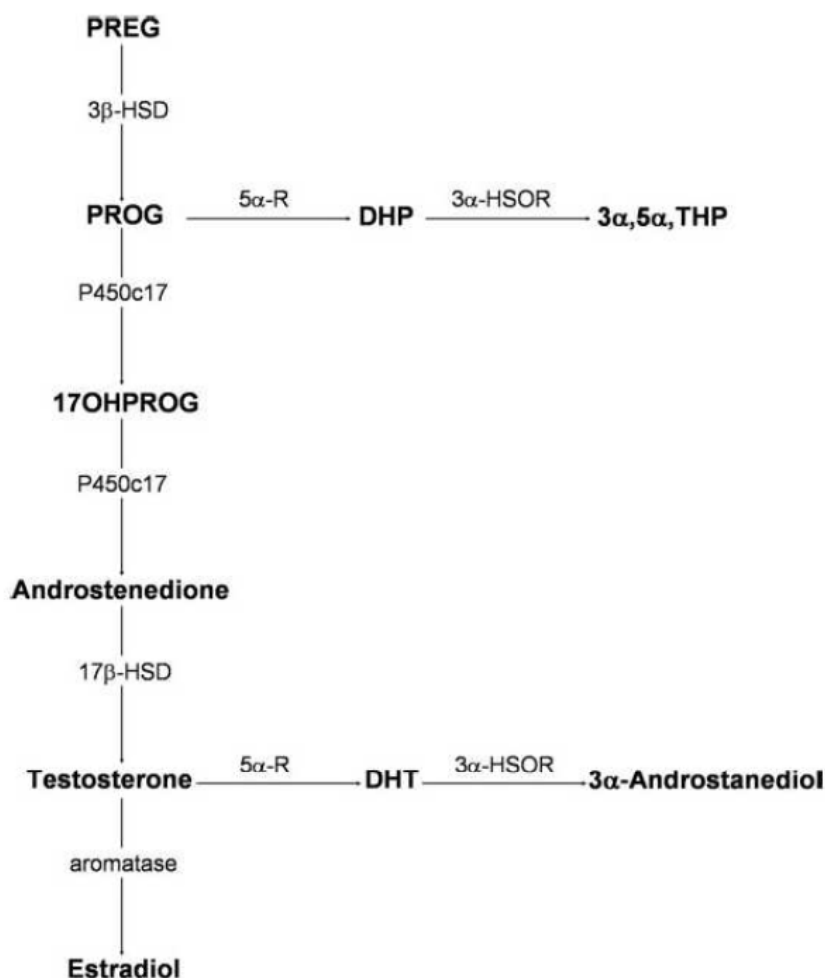
## RESULTS

Thanks to Western blot analyses, the stably transfected SH-SY5Y cells used in the present work have

previously been well characterized as overexpressing the corresponding protein, that is, the wild-type hTau40, the pathogenic P301L tau, or APPwt compared to native neuroblastoma cells or to control cells transfected with empty vector (Scheuermann et al., 2001; Ferrari et al., 2003).

## Morphological Analysis

The native human neuroblastoma SH-SY5Y cells exhibited a neuroblast-like morphology with well-differentiated perykaria (arrows) and occasional short neurites (arrowheads) as shown in Figure 1(A). Stable transfection of SH-SY5Y cells with the expression



**Figure 2** Biochemical pathways of unconjugated steroids from the precursor pregnenolone. 3 $\beta$ HSD, 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase; P450c17, cytochrome P450c17 or 17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20 lyase; 17 $\beta$ -HSD, 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase; 5 $\alpha$ -R, 5 $\alpha$ -reductase; 3 $\alpha$ -HSOR, 3 $\alpha$ -hydroxysteroid oxidoreductase; PREG, pregnenolone; PROG, progesterone; 17OHPROG, 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone; DHP, dihydroprogesterone; 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,THP, 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$  tetrahydroprogesterone; DHT, dihydrotestosterone.

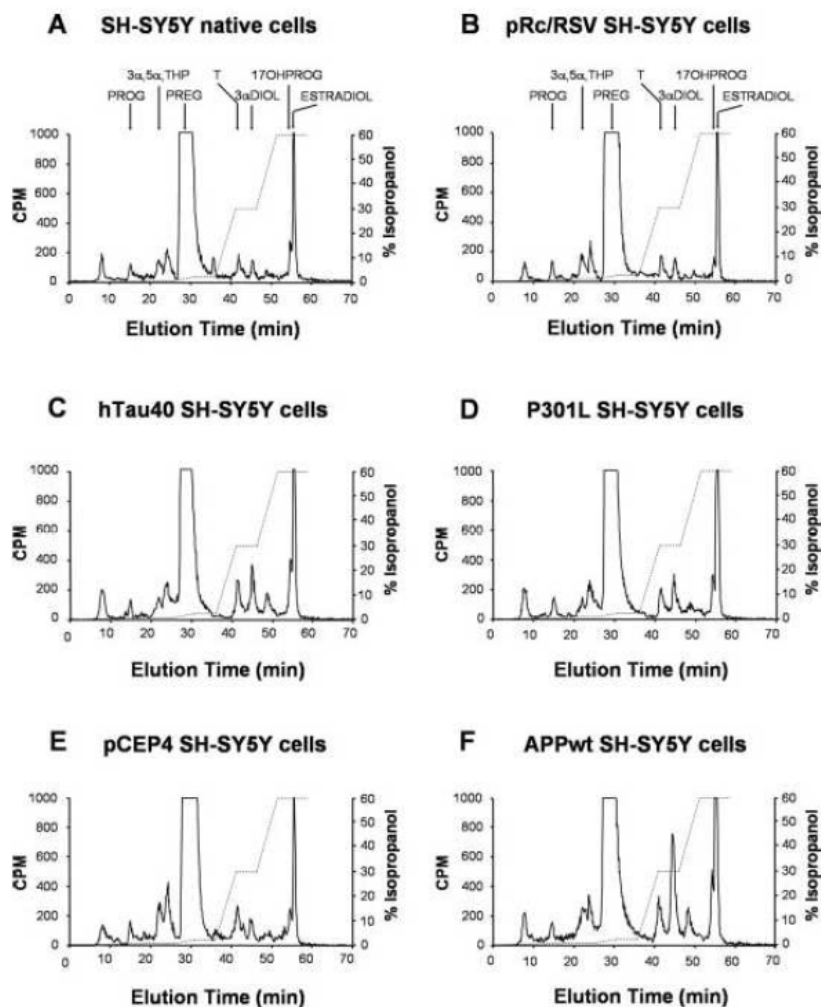
vector pRc/RSV, which was either empty [Fig. 1(B)] or harboring expression constructs encoding the wild-type hTau40 [Fig. 1(C)] or the pathogenic P301L mutant tau [Fig. 1(D)], did not modify the morphological aspect of the cells. Similarly, there were no detectable changes in the morphology of SH-SY5Y cells transfected with the pCEP4 vector alone or harboring the APPwt cDNA [Fig. 1(E,F)].

### Neurosteroidogenesis in SH-SY5Y Cells

The biosynthesis of neurosteroids was investigated in native and stably transfected SH-SY5Y cells by determining their capacity to convert pregnenolone

(the precursor of all classes of steroids) into steroidal metabolites. The conventional steroid biosynthetic pathway from the precursor pregnenolone is recapitulated in Figure 2.

A 3 h incubation of native or stably transfected SH-SY5Y cells with [ $^3$ H]PREG yielded the formation of several tritiated metabolites. Reversed-phase HPLC analysis coupled with Flo/One characterization of steroids showed that the main [ $^3$ H]-steroids newly synthesized from the precursor [ $^3$ H]PREG in all categories of cells were [ $^3$ H]PROG, [ $^3$ H]3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,THP, [ $^3$ H]17OHPROG, [ $^3$ H]T, [ $^3$ H]3 $\alpha$ DIOL, and [ $^3$ H]Estradiol (Fig. 3). Quantitative analyses revealed no difference in neurosteroid production in native [Fig.



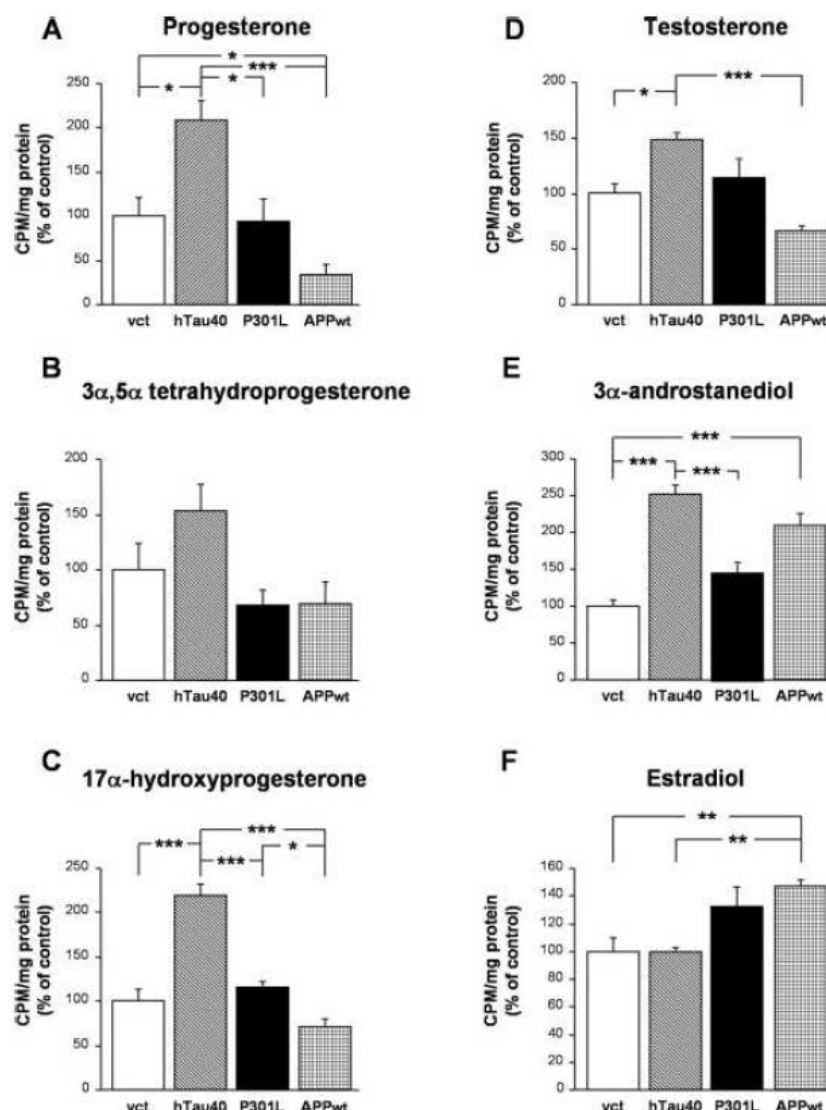
**Figure 3** Characterization of [ $^3\text{H}$ ]-neurosteroids produced, after a 3 h incubation with [ $^3\text{H}$ ]PREG, by native SH-SY5Y cells (A) and transfected cells with pRc/RSV vector alone (B), hTau40 (C), mutant P301L tau (D), pCEP4 vector alone (E), or APPwt (F). Analyses were performed using a hexane/isopropanol gradient and a reverse-HPLC system coupled to a flow scintillation detector. The ordinate indicates the radioactivity measured in the HPLC eluent. The dashed line represents the gradient of secondary solvent (% isopropanol). The arrows indicate elution positions of standard steroids. PROG, progesterone;  $3\alpha,5\alpha$ ,THP,  $3\alpha,5\alpha$  tetrahydroprogesterone; PREG, pregnenolone; T, testosterone;  $3\alpha$ DIOL,  $3\alpha$ -androstenediol; 17OHPROG,  $17\alpha$ -hydroxyprogesterone.

3(A)] and vector control [Fig. 3(B,E)] cells. The overexpression of hTau40 strongly stimulated the production of [ $^3\text{H}$ ]PROG (+107.6%;  $p < 0.05$ ) while the expression of P301L did not affect the biosynthesis of this neurosteroid [Fig. 4(A)]. In APPwt SH-SY5Y cells, the formation of [ $^3\text{H}$ ]PROG significantly decreased (−66.3%;  $p < 0.05$ ) compared to the corresponding vector control [Fig. 4(A)]. As shown in Figure 4(B), the production of [ $^3\text{H}$ ]3 $\alpha,5\alpha$ ,THP was not modified by hTau40, P301L, or APPwt overexpression in SH-SY5Y cells.

The conversion of [ $^3\text{H}$ ]PREG into [ $^3\text{H}$ ]17OHPROG and [ $^3\text{H}$ ]T was significantly enhanced by hTau40 (+119%;  $p < 0.001$  and +49%;  $p < 0.05$ , respectively), while this biosynthetic pathway was not affected by P301L and APPwt overexpression [Fig. 4(C,D)].

The biosynthesis of the neurosteroid [ $^3\text{H}$ ]3 $\alpha$ DIOL, which was unaffected by P301L, significantly increased in hTau40 SH-SY5Y cells (+151%;  $p < 0.001$ ) and APPwt SH-SY5Y cells (+108%;  $p < 0.001$ ) compared to the respective controls [Fig. 4(E)].



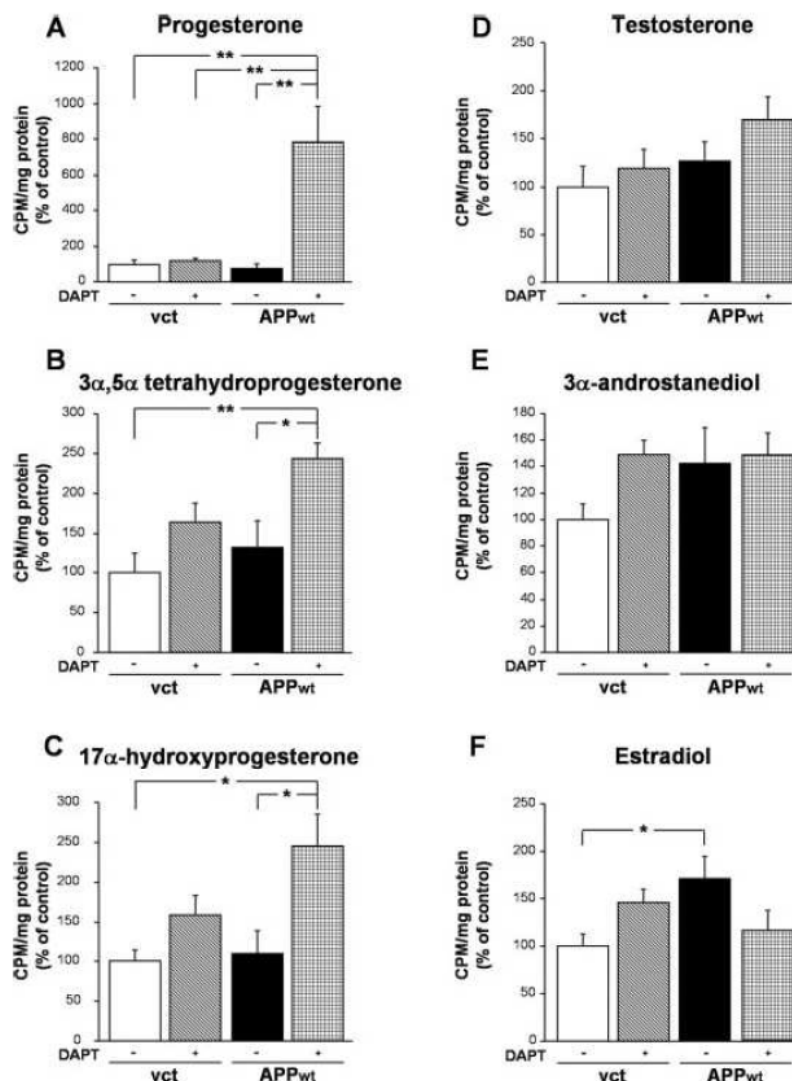


**Figure 4** Effects of overexpression of hTau40, mutant P301L tau, and APPwt on the conversion of [ $^3$ H]PREG into [ $^3$ H]PROG (A), [ $^3$ H]3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,THP (B), [ $^3$ H]17OHPROG (C), [ $^3$ H]T (D), [ $^3$ H]3 $\alpha$ DIOL (E), and [ $^3$ H]Estradiol (F) in SH-SY5Y cells. The values were obtained from experiments similar to that presented in Figure 3. Each value was calculated as the relative amount of [ $^3$ H]-neurosteroid compared with the total [ $^3$ H]-labeled compounds resolved by HPLC-Fluoro/One characterization ( $\times 100$ ) and was normalized with the protein concentration. The values were then expressed as percentages of the amount of each steroid formed in the corresponding vector (vct) control cell line (pRc/RSV alone for the cells transfected with hTau40 or P301L and pCEP4 alone for the cells transfected with APPwt). Each value is the mean  $\pm$  SEM of four independent experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

While hTau40 and P301L did not affect the production of [ $^3$ H]Estradiol from [ $^3$ H]PREG, the overexpression of APPwt significantly stimulated [ $^3$ H]Estradiol synthesis (+48%;  $p < 0.01$ ) in SH-SY5Y cells [Fig. 4(F)].

In order to determine whether the action of APPwt overexpression on neurosteroidogenesis depends on APPwt itself or on the associated increased genera-

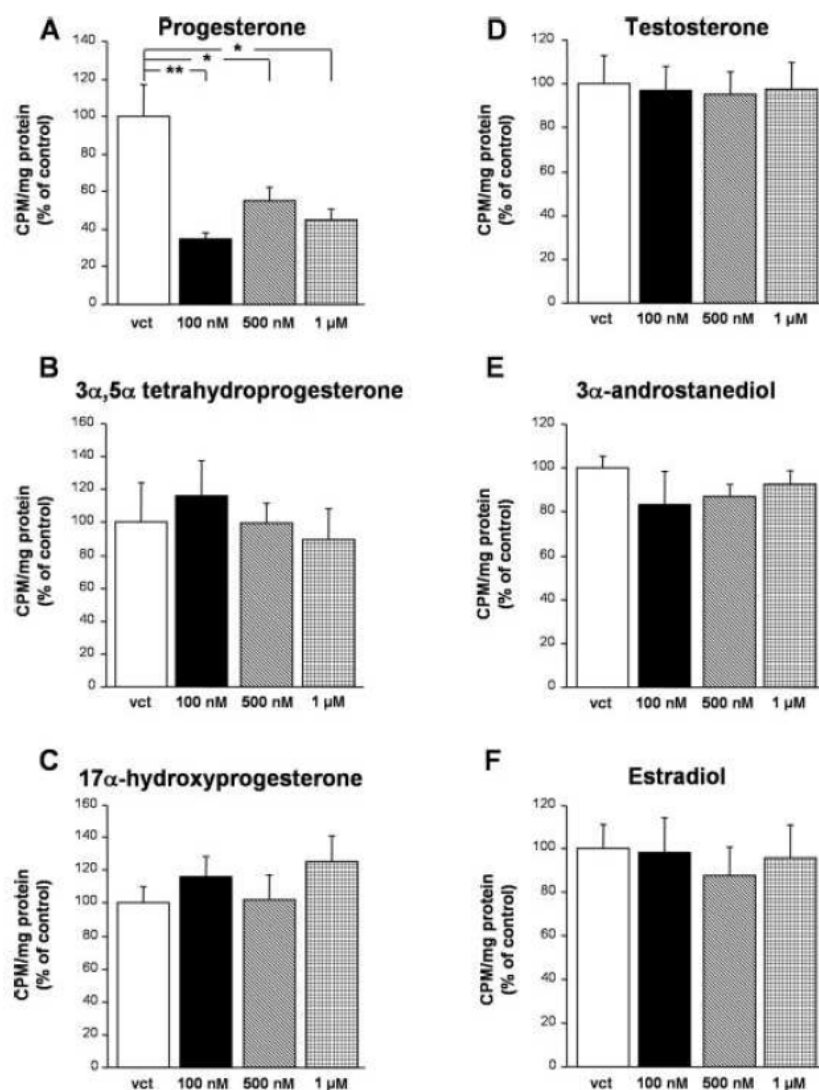
tion of human amyloid protein (A $\beta$ ), we investigated the conversion of [ $^3$ H]PREG into [ $^3$ H]-neurosteroids in the presence of DAPT, a functional  $\gamma$ -secretase inhibitor that reduces intracellular A $\beta$  levels without affecting APP expression (Keil et al., 2004). As shown in Figure 5(A–C), treatment with DAPT strongly enhanced the production of [ $^3$ H]PROG,



**Figure 5** Effect of DAPT (1  $\mu$ M) on [ $^3$ H]PREG conversion into [ $^3$ H]PROG (A), [ $^3$ H]3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,THP (B), [ $^3$ H]17OHPROG (C), [ $^3$ H]T (D), [ $^3$ H]3 $\alpha$ DIOL (E), and [ $^3$ H]Estradiol (F) in APPwt SH-SY5Y cells or the corresponding vector control cell line (vct). The values were obtained from experiments similar to that presented in Figure 3. Each value was calculated as the relative amount of [ $^3$ H]-neurosteroid compared with the total [ $^3$ H]-labeled compounds resolved by HPLC-Flo/One characterization ( $\times 100$ ) and was normalized to the protein concentration. Results were then expressed as percentages of the amount of each steroid formed in control cells, that is, SH-SY5Y cells transfected with the empty pCEP4 vector in the absence of DAPT. Values are the mean  $\pm$  SEM of four independent experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

[ $^3$ H]3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,THP, and [ $^3$ H]17OHPROG in APPwt SH-SY5Y cells, while the formation of these steroids was not significantly modified in the treated corresponding control cells. The biosynthesis of [ $^3$ H]T, [ $^3$ H]3 $\alpha$ DIOL, and [ $^3$ H]Estradiol was unaffected in APPwt SH-SY5Y cells treated with DAPT [Fig. 5(D–F)]. Exposure of control cells to increasing concentrations of

extracellularly applied aggregated A $\beta_{25-35}$  fragment revealed a decreased synthesis of [ $^3$ H]PROG at 100 nM (–65%;  $p < 0.01$ ), 500 nM (–45%;  $p < 0.05$ ), and 1  $\mu$ M (–55%;  $p < 0.05$ ), but the formation of [ $^3$ H]3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,THP, [ $^3$ H]17OHPROG, [ $^3$ H]T, [ $^3$ H]3 $\alpha$ DIOL, and [ $^3$ H]Estradiol was not altered by different A $\beta_{25-35}$  concentrations (Fig. 6).



**Figure 6** Effects of increasing concentrations (100 nM, 500 nM, 1 μM) of preaggregated A $\beta_{25-35}$  on [ $^3$ H]PREG conversion into [ $^3$ H]PROG (A), [ $^3$ H]3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ .THP (B), [ $^3$ H]17OHPROG (C), [ $^3$ H]T (D), [ $^3$ H]3 $\alpha$ DIOL (E), and [ $^3$ H]Estradiol (F) in SH-SY5Y cells transfected with the empty pCEP4 vector. The values were obtained from experiments similar to that presented in Figure 3. Each value was calculated as the relative amount of [ $^3$ H]-neurosteroid compared with the total [ $^3$ H]-labeled compounds resolved by HPLC-Flo/One characterization (x100) and was normalized to the protein concentration. Results were then expressed as percentages of the amount of each steroid formed in untreated control cells. Values are the mean  $\pm$  SEM of four independent experiments. \* $p$  < 0.05; \*\* $p$  < 0.01.

## DISCUSSION

Measurements in the cerebrospinal fluid of AD patients or postmortem assessment of brain concentrations of DHEAS and PREGS have recently suggested a possible correlation between neurosteroidogenesis and etiological components of AD (Weill-Engerer et al., 2002; Kim et al., 2003). However, the

effects of key proteins involved in AD on neurosteroid production have never been investigated. In addition, although several studies in animals indicated that neurosteroids may participate in the regulation of neurodegenerative mechanisms (Koenig et al., 1995; Melcangi et al., 2003; Schumacher et al., 2004), the involvement of the process of neurosteroid biosynthesis in the protection of human nerve cells



was not determined. The present work clearly shows that the capacity to newly synthesize PROG, 17OHPROG, T, and  $3\alpha$ DIOL from the precursor PREG was enhanced in human neuroblastoma SH-SY5Y cells well-known to overexpress the human wild-type tau protein (Ferrari et al., 2003). Unlike hTau40, the mutant tau P301L is totally devoid of significant action on neurosteroid production in SH-SY5Y cells. The wild-type tau protein, which acts as a promoter of tubulin polymerization, is involved in axonal transport and, by inhibiting the rate of microtubule depolymerization, it contributes to the stabilization of the cytoskeleton and neuritic outgrowth (Weingarten et al., 1975; Cleveland et al., 1977a,b; Drechsel et al., 1992; Brandt and Lee, 1994). The most obvious pathological event in several neurodegenerative disorders is abnormal phosphorylation of tau proteins leading to their aggregation into intraneuronal filamentous inclusions (for review, Buée et al., 2000). Transgenic mice overexpressing the P301L mutant human tau protein exhibited an accumulation of hyperphosphorylated tau and developed neurofibrillary tangles (Lewis et al., 2000; Götz et al., 2001a,b; David et al., 2005). In addition, several neurodegenerative disorders in humans are associated with P301L mutation of tau protein, which provokes neurofibrillary lesions in frontotemporal dementia with Parkinsonism linked to chromosome 17 (Hutton et al., 1998; Poorkaj et al., 1998; Spillantini et al., 1998). Therefore, the fact that the strong stimulatory action induced by the overexpression of the wild-type tau on neurosteroid biosynthesis in SH-SY5Y cells cannot be reproduced by the mutant P301L tau indicates that the process of neurosteroidogenesis may belong to cellular mechanisms only activated by wild-type tau to stabilize the cytoskeleton and to protect nerve cells against degeneration. In support of this suggestion, recent studies have shown that endogenous synthesis of the neurosteroid PREG in nerve cells promotes microtubule assembly and the development of cytoskeleton by increasing tubulin polymerization (Murakami et al., 2000; Plassart-Schies and Baulieu, 2001). In addition, our data revealed that the stimulatory action of hTau40 was particularly high on the neosynthesis of PROG, which has previously been shown as a potent neuroprotective steroid in the central and peripheral nervous systems (Koenig et al., 1995; Ghoumari et al., 2003; Melcangi et al., 2003; Schumacher et al., 2004). The overexpression of hTau40 also enhanced in SH-SY5Y cells the production of  $3\alpha$ DIOL, another neurosteroid exerting neuroprotective effects like PROG. (Frye and McCormick, 2000; Reddy, 2004). Moreover, the suppression of tau-evoked stimulatory action on neurosteroido-

genesis caused by P301L mutation is perfectly in agreement with recent proteomic and functional analyses, which demonstrated in P301L tau transgenic mice a serious dysfunction of the mitochondrial system that plays a crucial role in steroid biosynthesis (David et al., 2005).

The effects of APPwt overexpression on the process of neurosteroidogenesis in SH-SY5Y cells were steroid-dependent. Indeed, expression of APPwt, which inhibited the formation of PROG from PREG, did not affect the production of 17OHPROG and T, and stimulated the neosynthesis of  $3\alpha$ DIOL and estradiol. This result suggests that APPwt itself and/or the increased generation of A $\beta$  due to the overexpression of APPwt in these cells (Scheuermann et al., 2001) exert different actions on the enzymatic machinery responsible for neurosteroid production. To clarify the situation, we treated APPwt SH-SY5Y cells with DAPT, which is a selective inhibitor of  $\gamma$ -secretase, one of the key enzymes that catalyzes the conversion of APPwt into A $\beta$  without affecting APP expression levels (Dovey et al., 2001; Lanz et al., 2003). After treatment with DAPT, the production of PROG from PREG was strongly stimulated in APPwt SH-SY5Y cells, while in untreated cells the synthesis of PROG was inhibited. Therefore, it appears that, under normal conditions (in the absence of DAPT), the endogenous APPwt overexpressed in APPwt-transfected cells was converted in a derivative peptide, which in turn inhibited the synthesis of PROG. In contrast, when the enzymatic activity of  $\gamma$ -secretase was blocked in APPwt SH-SY5Y cells by DAPT, the stimulatory action on PROG biosynthesis may have been provoked by soluble APP (APP $\alpha$  or  $\beta$ ) or by a transmembrane carboxy-terminal fragment ( $\alpha$ - or  $\beta$ -CTF). Indeed, APPwt is usually cleaved by  $\alpha$ - or  $\beta$ -secretase into APP $\alpha$  or  $\beta$  and  $\alpha$ - or  $\beta$ -CTF, respectively. Then,  $\gamma$ -secretase cleaves CTFs, releasing p3 from  $\alpha$ -CTF and A $\beta$  from  $\beta$ -CTF (Selkoe, 2001; Wilquet and De Strooper, 2004). Therefore, the treatment of APPwt SH-SY5Y cells by DAPT in our study prevented the formation of A $\beta$ , the accumulation of which induces neurotoxic events in AD (Hensley et al., 1994; Lorenzo and Yankner, 1994; Mattson, 1997; Small and McLean, 1999). Consequently, decreased production of PROG and increased formation of  $3\alpha$ DIOL and estradiol observed in APPwt SH-SY5Y cells in the absence of DAPT may probably depend on A $\beta$ . This hypothesis is supported by the fact that DAPT-induced  $\gamma$ -secretase inhibition followed by suppression of intracellular generation of A $\beta$  allowed the detection of the potentially stimulatory effects of APP $\alpha/\beta$  or  $\alpha/\beta$ -CTF not only on PROG synthesis, but also on the biosynthesis of

3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,THP and 17OHPROG. Moreover, the increased production of 3 $\alpha$ DIOL and estradiol observed under normal culture conditions (i.e., when A $\beta$  intracellular concentration was high) completely disappeared when APPwt SH-SY5Y cells were treated with the  $\gamma$ -secretase inhibitor. To confirm the potential effect of endogenous A $\beta$  suggested by the series of results obtained with or without DAPT pretreatment, we tested directly the effects of exogenous or aggregated synthetic A $\beta_{25-35}$  on neurosteroid production in SH-SY5Y cells. The synthetic A $\beta_{25-35}$  exactly reproduced the inhibitory action suspected for the endogenous peptide on PROG formation but was unable to enhance 3 $\alpha$ DIOL and estradiol synthesis in the same concentration range. This observation suggests that the key steroidogenic enzymes responsible for the synthesis of PROG (3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase, 3 $\beta$ HSD), 3 $\alpha$ DIOL (3 $\alpha$ -hydroxysteroid oxidoreductase, 3 $\alpha$ HSOR), and estradiol (aromatase) are not sensitive in a similar manner to A $\beta$ . It is also possible that the action on neurosteroidogenesis of extracellular treatment of SH-SY5Y cells with A $\beta_{25-35}$  may not be efficient or comparable to that evoked by intracellular generation and/or accumulation of A $\beta$  as previously described for mitochondrial activity and nitric oxide production in PC12 cells (Keil et al., 2004). In particular, effectiveness of the exogenous peptide A $\beta_{25-35}$  appeared as restricted to the first step of the biosynthetic pathways (PREG conversion into PROG), while the endogenous A $\beta$  accumulated in the intracellular compartment, which had access to all enzymatic reactions, was able to decrease PROG production with a concomitant increase of 3 $\alpha$ DIOL and estradiol formation. Up-regulation of estradiol synthesis in APPwt SH-SY5Y cells in the absence of DAPT may be a protective mechanism activated by these cells against neurotoxic events generally induced by intracellular generation and/or accumulation of A $\beta$ . In support of this suggestion, various studies have shown evidence for neuroprotective actions of estradiol and the importance of aromatase regulation under neurodegenerative conditions, as well as the pivotal role played by extragonadal or endogenously synthesized estrogen in neuroprotection (Garcia-Segura et al., 1999, 2001, 2003; Azcoitia et al., 2001; McCullough et al., 2003; Veiga et al., 2005).

In conclusion, our investigations demonstrate that the overexpression of specific key proteins of AD or neurodegenerative disorders did not modify the morphology of SH-SY5Y cells but completely changed their biochemical activity responsible for neurosteroid production. The results presented herein reveal that AD key proteins control the biological activity of the enzymatic machinery producing neurosteroids, as

significant changes of neurosteroidogenesis have been detected in SH-SY5Y cells according to the protein overexpressed by the neuroblastoma cells. However, further investigations will certainly help to clarify the specific mechanisms used by AD proteins to control neurosteroid-synthesizing enzymes, even though it has been well demonstrated that AD proteins including tau and A $\beta$  seriously interfere with the mitochondrial system, which determines the activity of several steroid-producing enzymes (Baulieu et al., 1999; Mensah-Nyagan et al., 1999; Keil et al., 2004; Payne and Hales, 2004; David et al., 2005). This first demonstration of an action of key proteins involved in neurodegenerative diseases on neurosteroidogenesis strongly emphasizes the hypothesis that endogenous neurosteroids may participate in the control of degenerative mechanisms in human nerve cells. The process of neurosteroid biosynthesis appears as one of the endogenous mechanisms activated by the human wild-type tau protein to control the stabilization of the cytoskeleton and to protect nerve cells against degeneration. Pathogenic mutation of tau protein or accumulation of A $\beta$  provoked by toxic events may reduce neurosteroidogenesis, at least the formation of neuroprotective steroids, to promote degenerative mechanisms. Thus, identification of pharmacological agents capable of stimulating the production of endogenous protective neurosteroids *in vivo* may certainly open new perspectives for the treatment of neurodegenerative disorders in humans.

V.S. was the recipient of a fellowship from the Neuroscience Upper Rhine Network Neurex. We thank Dr Thomas Bayer (Saarland University, Homburg, Germany) and Dr Jürgen Götz (University of Sydney, Camperdown, Australia) for providing initial vials of transfected cells. Special thanks to Dr Paul Pevet (President of Neurex, Strasbourg), Dr Pascale Piguët (Scientific Coordinator of Neurex, Basel), and Mrs. Stephanie Klipfel (Administrative Director of Neurex, Strasbourg) for their kind support of this research program.

## REFERENCES

- Alonso AD, Grundke-Iqbal I, Barra HS, Iqbal K. 1997. Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:298–303.
- Azcoitia I, Sierra A, Veiga S, Honda S, Harada N, Garcia-Segura LM. 2001. Brain aromatase is neuroprotective. *J Neurobiol* 47:318–329.

- Baulieu EE, Robel P, Schumacher M. 1999. Contemporary Endocrinology. Totowa: Humana Press. 377 p.
- Bayer TA, Cappai R, Masters CL, Beyreuther K, Multhaup G. 1999. It all sticks together—the APP-related family of proteins and Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry* 4:524–528.
- Brandt R, Lee G. 1994. Orientation, assembly, and stability of microtubule bundles induced by a fragment of tau protein. *Cell Motil Cytoskel* 28:143–154.
- Brot MD, Akwa Y, Purdy RH, Koob GF, Britton KT. 1997. The anxiolytic-like effects of the neurosteroid allopregnanolone: interactions with GABA(A) receptors. *Eur J Pharmacol* 325:1–7.
- Buée L, Bussiere T, Buee-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR. 2000. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 33: 95–130.
- Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW. 1977a. Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J Mol Biol* 116:227–247.
- Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW. 1977b. Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol Biol* 116:207–225.
- Coulson EJ, Paliga K, Beyreuther K, Masters CL. 2000. What the evolution of the amyloid protein precursor supergene family tells us about its function. *Neurochem Int* 36:175–184.
- David DC, Hauptmann S, Scherping I, Schuessel K, Keil U, Rizzu P, Ravid R, et al. 2005. Proteomic and functional analyses reveal a mitochondrial dysfunction in P301L tau transgenic mice. *J Biol Chem* 280:23802–23814.
- Dovey HF, John V, Anderson JP, Chen LZ, de Saint Andrieu P, Fang LY, Freedman SB, et al. 2001. Functional gamma-secretase inhibitors reduce beta-amyloid peptide levels in brain. *J Neurochem* 76:173–181.
- Drechsel DN, Hyman AA, Cobb MH, Kirschner MW. 1992. Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol Biol Cell* 3:1141–1154.
- Ferrari A, Hoernli F, Baechli T, Nitsch RM, Götz J. 2003. Beta-Amyloid induces paired helical filament-like tau filaments in tissue culture. *J Biol Chem* 278:40162–40168.
- Frank C, Sagratella S. 2000. Neuroprotective effects of allopregnanolone on hippocampal irreversible neurotoxicity in vitro. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 24:1117–1126.
- Frye CA, McCormick CM. 2000. The neurosteroid, 3alpha-androstenediol, prevents inhibitory avoidance deficits and pyknotic cells in the granule layer of the dentate gyrus induced by adrenalectomy in rats. *Brain Res* 855:166–170.
- Garcia-Estrada J, Luquin S, Fernandez AM, Garcia-Segura LM. 1999. Dehydroepiandrosterone, pregnenolone and sex steroids down-regulate reactive astroglia in the male rat brain after a penetrating brain injury. *Int J Dev Neurosci* 17:145–151.
- Garcia-Segura LM, Azcoitia I, DonCarlos LL. 2001. Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol* 63:29–60.
- Garcia-Segura LM, Veiga S, Sierra A, Melcangi RC, Azcoitia I. 2003. Aromatase: a neuroprotective enzyme. *Prog Neurobiol* 71:31–41.
- Garcia-Segura LM, Wozniak A, Azcoitia I, Rodriguez JR, Hutchison RE, Hutchison JB. 1999. Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair. *Neuroscience* 89:567–578.
- Ghoumari AM, Dusart I, El-Etr M, Tronche F, Sotelo C, Schumacher M, Baulieu EE. 2003. Mifepristone (RU486) protects Purkinje cells from cell death in organotypic slice cultures of postnatal rat and mouse cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:7953–7958.
- Gonzalez Deniselle MC, Lopez-Costa JJ, Saavedra JP, Pietranera L, Gonzalez SL, Garay L, Guennoun R, et al. 2002. Progesterone neuroprotection in the Wobbler mouse, a genetic model of spinal cord motor neuron disease. *Neurobiol Dis* 11:457–468.
- Götz J, Chen F, Barmettler R, Nitsch RM. 2001a. Tau filament formation in transgenic mice expressing P301L tau. *J Biol Chem* 276:529–534.
- Götz J, Chen F, Van Dorpe J, Nitsch RM. 2001b. Formation of neurofibrillary tangles in P301L tau transgenic mice induced by A $\beta$ 42 fibrils. *Science* 293:1491–1494.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. 1986. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:4913–4917.
- Guarneri P, Cascio C, Piccoli T, Piccoli F, Guarneri R. 2000. Human neuroblastoma SH-SY5Y cell line: neurosteroid-producing cell line relying on cytoskeletal organization. *J Neurosci Res* 60:656–665.
- Guth L, Zhang Z, Roberts E. 1994. Key role for pregnenolone in combination therapy that promotes recovery after spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:12308–12312.
- Heber S, Herms J, Gajic V, Haeflner J, Aguzzi A, Rulicke T, von Kretschmar H, et al. 2000. Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J Neurosci* 20:7951–7963.
- Hensley K, Carney JM, Mattson MP, Aksenova M, Harris M, Wu JF, Floyd RA, et al. 1994. A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:3270–3274.
- Hodge CW, Raber J, McMahon T, Walter H, Sanchez-Perez AM, Olive MF, Mehmert K, et al. 2002. Decreased anxiety-like behavior, reduced stress hormones, and neurosteroid supersensitivity in mice lacking protein kinase Cepsilon. *J Clin Invest* 110:1003–1010.
- Hoyk Z, Parducz A, Garcia-Segura LM. 2004. Dehydroepiandrosterone regulates astroglia reaction to denervation of olfactory glomeruli. *Glia* 48:207–216.
- Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, Baker M, Froelich S, Houlden H, Pickering-Brown S, et al. 1998. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393:702–705.
- Iqbal K, Alonso Adel C, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong CX, Khatoon S, et al. 2005. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta* 1739:198–210.
- Jämsä A, Hasslund K, Cowburn RF, Backstrom A, Vasange M. 2004. The retinoic acid and brain-derived neurotro-

- phic factor differentiated SH-SY5Y cell line as a model for Alzheimer's disease-like tau phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 319:993–1000.
- Keil U, Bonert A, Marques CA, Scherping I, Weyermann J, Strosznajder JB, Muller-Spahn F, et al. 2004. Amyloid  $\beta$ -induced changes in nitric oxide production and mitochondrial activity lead to apoptosis. *J Biol Chem* 279: 50310–50320.
- Kibaly C, Patte-Mensah C, Mensah-Nyagan AG. 2005. Molecular and neurochemical evidence for the biosynthesis of dehydroepiandrosterone in the adult rat spinal cord. *J Neurochem* 93:1220–1230.
- Kim SB, Hill M, Kwak YT, Hampl R, Jo DH, Morfin R. 2003. Neurosteroids: Cerebrospinal fluid levels for Alzheimer's disease and vascular dementia diagnostics. *J Clin Endocrinol Metab* 88:5199–5206.
- Kimionides VG, Khatibi NH, Svendsen CN, Sofroniew MV, Herbert J. 1998. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA-sulfate (DHEAS) protect hippocampal neurons against excitatory amino acid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:1852–1857.
- Koenig HL, Schumacher M, Ferzaz B, Thi AN, Ressouches A, Guennoun R, Jung-Testas I, et al. 1995. Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann cells. *Science* 268:1500–1503.
- Kosik KS, Joachim CL, Selkoe DJ. 1986. Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:4044–4048.
- Lanz TA, Himes CS, Pallante G, Adams L, Yamazaki S, Amore B, Merchant KM. 2003. The gamma-secretase inhibitor N-[N-(3, 5-difluorophenyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester reduces A $\beta$  levels in vivo in plasma and cerebrospinal fluid in young (plaque-free) and aged (plaque-bearing) Tg2576 mice. *J Pharmacol Exp Ther* 305:864–871.
- Lewis J, McGowan E, Rockwood J, Melrose H, Nacharaju P, Van Slegtenhorst M, Gwinn-Hardy K, et al. 2000. Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nat Genet* 25:402–405.
- Li YP, Bushnell AF, Lee CM, Perlmuter LS, Wong SK. 1996. Beta-amyloid induces apoptosis in human-derived neurotypic SH-SY5Y cells. *Brain Res* 738:196–204.
- Lorenzo A, Yankner BA. 1994. Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by Congo red. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:12243–12247.
- Mailliot C, Bussiere T, Caillet-Boudin ML, Delacourte A, Buee L. 1998. Alzheimer-specific epitope of AT100 in transfected cell lines with tau: toward an efficient cell model of tau abnormal phosphorylation. *Neurosci Lett* 255:13–16.
- Majewska MD. 1992. Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABA<sub>A</sub> receptor. Mechanism of action and physiological significance. *Prog Neurobiol* 38: 379–395.
- Martini L, Magnaghi V, Melcangi RC. 2003. Actions of progesterone and its 5 $\alpha$ -reduced metabolites on the major proteins of the myelin of the peripheral nervous system. *Steroids* 68:825–829.
- Mattson MP. 1997. Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev* 77:1081–1132.
- Mayo W, Dellu F, Robel P, Cherkaoui J, Le Moal M, Baulieu EE, Simon H. 1993. Infusion of neurosteroids into the nucleus basalis magnocellularis affects cognitive processes in the rat. *Brain Res* 607:324–328.
- McCullough LD, Blizard K, Simpson ER, Öz OK, Hurn PD. 2003. Aromatase cytochrome P450 and extragonadal estrogen play a role in ischemic neuroprotection. *J Neurosci* 23: 8701–8705.
- Melcangi RC, Leonelli E, Magnaghi V, Gherardi G, Nobbio L, Schenone A. 2003. Mifepristone (RU 38486) influences expression of glycoprotein Po and morphological parameters at the level of rat sciatic nerve: in vivo observations. *Exp Neurol* 184:930–938.
- Melcangi RC, Maggi R, Martini L. 1993. Testosterone and progesterone metabolism in the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *J Steroid Biochem Mol Biol* 46:811–818.
- Mellon SH, Griffin LD. 2002. Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. *Trends Endocrinol Metab* 13: 35–43.
- Mensah-Nyagan AG, Beaujean D, Luu-The V, Pelletier G, Vaudry H. 2001a. Anatomical and biochemical evidence for the synthesis of unconjugated and sulfated neurosteroids in amphibians. *Brain Res Brain Res Rev* 37:13–24.
- Mensah-Nyagan AG, Do-Rego JL, Beaujean D, Luu-The V, Pelletier G, Vaudry H. 1999. Neurosteroids: expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the central nervous system. *Pharmacol Rev* 51:63–81.
- Mensah-Nyagan AG, Do-Rego JL, Beaujean D, Luu-The V, Pelletier G, Vaudry H. 2001b. Regulation of neurosteroid biosynthesis in the frog diencephalon by GABA and endopines. *Horm Behav* 40:218–225.
- Mensah-Nyagan AG, Do-Rego JL, Feuilloley M, Marcual A, Lange C, Pelletier G, Vaudry H. 1996a. In vivo and in vitro evidence for the biosynthesis of testosterone in the telencephalon of the female frog. *J Neurochem* 67:413–422.
- Mensah-Nyagan AG, Feuilloley M, Do-Rego JL, Marcual A, Lange C, Tonon MC, Pelletier G, et al. 1996b. Localization of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase and characterization of testosterone in the brain of the male frog. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:1423–1428.
- Mensah-Nyagan AG, Feuilloley M, Dupont E, Do-Rego JL, Leboulenger F, Pelletier G, Vaudry H. 1994. Immunocytochemical localization and biological activity of 3  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in the central nervous system of the frog. *J Neurosci* 14:7306–7318.
- Misonou H, Morishima-Kawashima M, Ihara Y. 2000. Oxidative stress induces intracellular accumulation of amyloid  $\beta$ -protein (A $\beta$ ) in human neuroblastoma cells. *Biochemistry* 39:6951–6959.
- Murakami K, Fellous A, Baulieu EE, Robel P. 2000. Pregnenolone binds to microtubule-associated protein 2 and stimulates microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:3579–3584.
- Neve RL, McPhie DL, Chen Y. 2000. Alzheimer's disease: a dysfunction of the amyloid precursor protein(1). *Brain Res* 886:54–66.



- Nishimoto I, Okamoto T, Matsuura Y, Takahashi S, Murayama Y, Ogata E. 1993. Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o). *Nature* 362:75–79.
- Olivieri G, Novakovic M, Savaskan E, Meier F, Baysang G, Brockhaus M, Muller-Spahn F. 2002. The effects of beta-estradiol on SHSY5Y neuroblastoma cells during heavy metal induced oxidative stress, neurotoxicity and beta-amyloid secretion. *Neuroscience* 113:849–855.
- Patchev VK, Hassan AH, Holsboer DF, Almeida OF. 1996. The neurosteroid tetrahydroprogesterone attenuates the endocrine response to stress and exerts glucocorticoid-like effects on vasopressin gene transcription in the rat hypothalamus. *Neuropsychopharmacology* 15:533–540.
- Patte-Mensah C, Kappes V, Freund-Mercier MJ, Tsutsui K, Mensah-Nyagan AG. 2003. Cellular distribution and bioactivity of the key steroidogenic enzyme, cytochrome P450side chain cleavage, in sensory neural pathways. *J Neurochem* 86:1233–1246.
- Patte-Mensah C, Kibaly C, Mensah-Nyagan AG. 2005. Substance P inhibits progesterone conversion to neuroactive metabolites in spinal sensory circuit: a potential component of nociception. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:9044–9049.
- Patte-Mensah C, Li S, Mensah-Nyagan AG. 2004. Impact of neuropathic pain on the gene expression and activity of cytochrome P450side-chain-cleavage in sensory neural networks. *Cell Mol Life Sci* 61:2274–2284.
- Payne AH, Hales DB. 2004. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr Rev* 25:947–970.
- Plassart-Schiess E, Baulieu EE. 2001. Neurosteroids: recent findings. *Brain Res Brain Res Rev* 37:133–140.
- Porkaj P, Bird TD, Wijsman E, Nemens E, Garruto RM, Anderson L, Andreadis A, et al. 1998. Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Ann Neurol* 43:815–825.
- Purdy RH, Morrow AL, Moore PH Jr, Paul SM. 1991. Stress-induced elevations of gamma-aminobutyric acid type A receptor-active steroids in the rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:4553–4557.
- Reddy DS. 2004. Testosterone modulation of seizure susceptibility is mediated by neurosteroids 3alpha-androstenediol and 17beta-estradiol. *Neuroscience* 129:195–207.
- Scheuermann S, Hamsch B, Hesse L, Stumm J, Schmidt C, Behr D, Bayer TA, et al. 2001. Homodimerization of amyloid precursor protein and its implication in the amyloidogenic pathway of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 276:33923–33929.
- Schumacher M, Guennoun R, Robert F, Carelli C, Gago N, Ghomari A, Gonzalez Deniselle MC, et al. 2004. Local synthesis and dual actions of progesterone in the nervous system: neuroprotection and myelination. *Growth Horm IGF Res* 14 Suppl A:S18–33.
- Schumacher M, Weill-Engerer S, Liere P, Robert F, Franklin RJ, Garcia-Segura LM, Lambert JJ, et al. 2003. Steroid hormones and neurosteroids in normal and pathological aging of the nervous system. *Prog Neurobiol* 71:3–29.
- Selkoe DJ. 2001. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81:741–766.
- Small DH, McLean CA. 1999. Alzheimer's disease and the amyloid beta protein: What is the role of amyloid? *J Neurochem* 73:443–449.
- Spillantini MG, Murrell JR, Goedert M, Farlow MR, Klug A, Ghetti B. 1998. Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:7737–7741.
- Stoffel-Wagner B. 2001. Neurosteroid metabolism in the human brain. *Eur J Endocrinol* 145:669–679.
- Tanaka T, Iqbal K, Trenkner E, Liu DJ, Grundke-Iqbal I. 1995. Abnormally phosphorylated tau in SY5Y human neuroblastoma cells. *FEBS Lett* 360:5–9.
- Tsutsui K, Ukena K, Usui M, Sakamoto H, Takase M. 2000. Novel brain function: biosynthesis and actions of neurosteroids in neurons. *Neurosci Res* 36:261–273.
- Vallée M, Mayo W, Darnaudery M, Corpechot C, Young J, Koehl M, Le Moal M, et al. 1997. Neurosteroids: deficient cognitive performance in aged rats depends on low pregnenolone sulfate levels in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:14865–14870.
- Vallée M, Mayo W, Koob GF, Le Moal M. 2001. Neurosteroids in learning and memory processes. *Int Rev Neurobiol* 46:273–320.
- Veiga S, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. 2005. Extragonadal synthesis of estradiol is protective against kainic acid excitotoxic damage to the hippocampus. *NeuroReport* 16:1599–1603.
- Wang J, Tung YC, Wang Y, Li XT, Iqbal K, Grundke-Iqbal I. 2001. Hyperphosphorylation and accumulation of neurofilament proteins in Alzheimer disease brain and in okadaic acid-treated SY5Y cells. *FEBS Lett* 507:81–87.
- Weill-Engerer S, David JP, Szadovitch V, Liere P, Eychenne B, Pianos A, Schumacher M, et al. 2002. Neurosteroid quantification in human brain regions: comparison between Alzheimer's and nondemented patients. *J Clin Endocrinol Metab* 87:5138–5143.
- Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. 1975. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:1858–1862.
- Wilquet V, De Strooper B. 2004. Amyloid-beta precursor protein processing in neurodegeneration. *Curr Opin Neurobiol* 14:582–588.
- Wozniak A, Hutchison RE, Morris CM, Hutchison JB. 1998. Neuroblastoma and Alzheimer's disease brain cells contain aromatase activity. *Steroids* 63:263–267.
- Yamatsuji T, Matsui T, Okamoto T, Komatsuzaki K, Takeda S, Fukumoto H, Iwatsubo T, et al. 1996. G protein-mediated neuronal DNA fragmentation induced by familial Alzheimer's disease-associated mutants of APP. *Science* 272:1349–1352.
- Zhong J, Iqbal K, Grundke-Iqbal I. 1999. Hyperphosphorylated tau in SY5Y cells: similarities and dissimilarities to abnormally hyperphosphorylated tau from Alzheimer disease brain. *FEBS Lett* 453:224–228.
- Zimmerberg B, Brown RC. 1998. Prenatal experience and postnatal stress modulate the adult neurosteroid and catecholaminergic stress responses. *Int J Dev Neurosci* 16:217–228.

## **II. Analyse comparative des effets des concentrations physiologiques et toxiques des peptides $\beta$ -amyloïdes 1-42 et 25-35 sur la neurostéroïdogénèse et la survie des neuroblastomes humains**

Il est bien démontré que des concentrations élevées (supérieures à 10  $\mu$ M) ou l'accumulation de peptides A $\beta$  sont responsables des plaques amyloïdes dans le cerveau des patients Alzheimer. Les plaques amyloïdes constituent avec les dégénérescences neurofibrillaires les principales lésions provoquant les troubles cognitifs ou la démence de type Alzheimer (Kosik 1992 ; Selkoe 2001 ; Turner et coll. 2003 ; Goedert et Spillantini 2006). Néanmoins, il existe aussi de nombreux travaux suggérant que, contrairement aux concentrations élevées qui sont neurodélétères, les doses physiologiques ou nanomolaires de peptides A $\beta$  seraient plutôt neuroprotectrices en exerçant des effets trophiques, anti-oxydants et anti-apoptotiques (Whitson et coll. 1989 ; Koo et coll. 1993 ; Chan et coll. 1999a ; Atwood et coll. 2003). Nous avons alors émis l'hypothèse que les doses physiologiques ou non-toxiques d'A $\beta$  pourraient induire leurs effets trophiques et protecteurs sur les cellules nerveuses en stimulant la biosynthèse des neurostéroïdes endogènes neuroprotecteurs dont la formation serait au contraire inhibée par les concentrations élevées ou toxiques d'A $\beta$ . Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé l'approche combinant le pulse-chase, l'HPLC et le Flo/One pour comparer les effets des concentrations physiologiques et toxiques du peptide pathogène A $\beta_{1-42}$  et du fragment A $\beta_{25-35}$  sur la neurostéroïdogénèse dans les neuroblastomes humains SH-SY5Y. Dans le but d'identifier avec précision les concentrations d'A $\beta_{1-42}$  et d'A $\beta_{25-35}$  à tester sur la neurostéroïdogénèse, c'est-à-dire les doses à considérer comme non-toxiques (physiologiques) et toxiques pour les cellules SH-SY5Y, nous avons au préalable utilisé la méthode de *MTT reduction assay* pour évaluer les effets de concentrations

nanomolaires (100, 500, 1 000 nM) ou micromolaires (12  $\mu$ M) d'A $\beta_{1-42}$  et d'A $\beta_{25-35}$  sur la survie des neuroblastomes.

## **II.1. Effets d'A $\beta_{1-42}$ et A $\beta_{25-35}$ sur la viabilité des cellules SH-SY5Y**

Notre étude dose-réponse a révélé que, 24h après le traitement, les concentrations nanomolaires (100, 500, 1 000 nM) d'A $\beta_{1-42}$  et d'A $\beta_{25-35}$  n'induisent pas de mort ou de cytotoxicité des cellules SH-SY5Y alors que la dose de 12  $\mu$ M provoque 68% (A $\beta_{1-42}$ ) ou 49% (A $\beta_{25-35}$ ) de mort cellulaire.

## **II.2. Analyse comparative des effets d'A $\beta_{1-42}$ et A $\beta_{25-35}$ sur la neurostéroïdogénèse**

La combinaison du pulse-chase, de l'HPLC et du Flo/One a montré que les concentrations physiologiques d'A $\beta_{1-42}$ , de façon très sélective, inhibent la production de progestérone mais stimulent celle d'œstradiol à partir du précurseur prégnénolone. Les doses physiologiques d'A $\beta_{25-35}$  réduisent aussi la néosynthèse de progestérone mais n'affectent pas la production d'œstradiol dans les neuroblastomes humains SH-SY5Y. A des concentrations élevées (12  $\mu$ M), aussi bien l'A $\beta_{1-42}$  que l'A $\beta_{25-35}$  inhibent la biosynthèse de progestérone mais seul l'A $\beta_{1-42}$  réduit la formation d'œstradiol à partir de prégnénolone. Les résultats démontrent donc l'existence d'une action sélective et séquence peptidique dépendante des concentrations nanomolaires ou physiologiques des A $\beta$  sur la neurostéroïdogénèse dans les neuroblastomes humains. Nos données apportent des éléments permettant d'expliquer (au moins partiellement) la capacité du peptide A $\beta_{1-42}$  à exercer selon sa concentration des effets protecteurs (à faibles doses) ou délétères (à fortes doses). Le fait que des doses physiologiques d'A $\beta_{1-42}$  stimulent la biosynthèse du neurostéroïde protecteur œstradiol et que

cette action stimulatrice s'inverse en effet inhibiteur lorsque les concentrations d'A $\beta_{1-42}$  deviennent élevées (>10  $\mu$ M), permet de comprendre que A $\beta_{1-42}$  pourrait effectivement être neuroprotecteur ou neurodégénératif selon les cas.

**Les figures et illustrations relatives aux résultats décrits dans le chapitre II sont incluses dans l'article ci-joint soumis pour publication. Cet article contient également des détails et informations complémentaires sur les travaux abordés dans ce chapitre.**



## Rapid communication

**Dose-dependent and sequence-sensitive effects of  $\beta$ -amyloid peptide on neurosteroidogenesis in human neuroblastoma cells**

Véronique Schaeffer<sup>a</sup>, Christine Patte-Mensah<sup>a</sup>, Anne Eckert<sup>b</sup>, Ayikoe G. Mensah-Nyagan<sup>a\*</sup>.

<sup>a</sup> Equipe Stéroïdes et Système Nociceptif, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Centre National de la Recherche Scientifique/Université Louis Pasteur, 21 rue René Descartes, 67 084 Strasbourg Cedex, France.

<sup>b</sup> Neurobiology Research Laboratory, Psychiatric University Clinic, Wilhelm Klein-Strasse 27, CH-4025 Basel, Switzerland.

Correspondence should be addressed to Prof. A.G. Mensah-Nyagan, Equipe Stéroïdes et Système Nociceptif, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Centre National de la Recherche Scientifique/Université Louis Pasteur, 21 rue René Descartes, 67084 Strasbourg Cedex, France. Tel: (33) 390 24 14 38, Fax: (33) 388 61 33 47; E-Mail: [gmensah@neurochem.u-strasbg.fr](mailto:gmensah@neurochem.u-strasbg.fr).

## Abstract

Interactions between neurosteroidogenesis and proteins involved in age-related diseases are unknown. High concentrations of amyloid- $\beta$  peptides ( $A\beta$ ) induce plaques in Alzheimer's disease but several studies demonstrated that physiological or non-toxic doses are neuroprotective. We compared the effects of non-toxic and toxic concentrations of  $A\beta_{1-42}$  and  $A\beta_{25-35}$  on neurosteroidogenesis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. Viability assays revealed that nanomolar doses of  $A\beta$  are devoid of cytotoxicity while 12- $\mu$ M induced cell death. Pulse-chase, high-performance-liquid-chromatography and flow-scintillation analyses showed that non-toxic  $A\beta_{1-42}$  concentrations, acting selectively, decreased [ $^3$ H]progesterone but increased [ $^3$ H]estradiol production from the precursor [ $^3$ H]pregnenolone. Non-toxic  $A\beta_{25-35}$  doses reduced [ $^3$ H]progesterone formation but had no effect on [ $^3$ H]estradiol biosynthesis. At 12- $\mu$ M, both  $A\beta_{1-42}$  and  $A\beta_{25-35}$  inhibited [ $^3$ H]progesterone formation but only  $A\beta_{1-42}$  reduced [ $^3$ H]estradiol production. The results demonstrate a selective and amino-acid sequence dependent action of  $A\beta$  on neurosteroidogenesis. The fact that non-toxic  $A\beta_{1-42}$  doses stimulated neuroprotective-neurosteroid estradiol synthesis, which is inhibited by high  $A\beta_{1-42}$  doses, may explain  $A\beta_{1-42}$  ability to exert either protective or deleterious effects on nerve cells.

*Keywords:* Amyloid  $\beta$  peptide; cell survival; cell viability; neuroactive steroid; neurodegenerative disease; neuroprotection; steroids and nervous system

**Running title:**  $\beta$ -amyloid peptide and neurosteroid production

Although the process of neurosteroidogenesis has been well demonstrated in humans, little is known on the role of endogenous neurosteroids in the regulation of cellular mechanisms involved in human nervous system pathophysiology (Baulieu et al., 1999; Stoffel-Wagner, 2001). In particular, post-mortem quantifications have suggested a possible correlation of decreased brain levels of neurosteroids with Alzheimer's disease (AD)-related dementia (Weill-Engerer et al., 2002) but the direct interactions between the process of neurosteroidogenesis and the activity of key etiological factors/proteins involved in neural or age-related diseases had never been investigated. AD, the most frequent neurodegenerative disease in humans, is characterized by an amyloidogenic pathway responsible for  $\beta$ -amyloid plaques which constitute with neurofibrillary tangles the pivotal lesions (Kosik, 1992; Selkoe, 2001; Goedert and Spillantini, 2006). High concentrations of  $A\beta$  ( $> 10 \mu M$ ) are well-known to generate cytotoxicity and cell death through mechanisms involving hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ )-evoked oxidative stress which is considered as a pivotal causal factor in AD (Miranda et al., 2000). In agreement with these findings, we have recently observed that  $H_2O_2$  kills human neuroblastoma SH-SY5Y cells by down-regulating the biosynthesis of the neuroprotective neurosteroid estradiol, suggesting that toxic concentrations of  $A\beta$  may be negative regulator of neurosteroidogenesis in human nerve cells (Schaeffer et al., 2007). However, several lines of evidence have shown that physiological or nanomolar concentrations of  $A\beta$  exhibit trophic, anti-oxidant, anti-apoptotic or neuroprotective effects (Whitson et al., 1989; Koo et al., 1993; Atwood et al., 2003). Therefore, we made the hypothesis that physiological or non-toxic concentrations of  $A\beta$  may induce trophic and/or protective effects on human nerve cells by stimulating the endogenous production of neuroprotective neurosteroids which may be inhibited by  $A\beta$  toxic doses. To check our hypothesis, we decided to use the well-validated method combining pulse-chase experiments, high performance liquid chromatography (HPLC) and flow-scintillation detection (Mensah-

Nyagan et al., 1994, 1996; Patte-Mensah et al., 2003, 2005) to compare the effects of physiological and toxic concentrations of the full-length pathogenic peptide A $\beta$ <sub>1-42</sub> and A $\beta$ <sub>25-35</sub> fragment on neurosteroidogenesis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. This cell line, which displays neuronal phenotype and properties, is considered as a representative cellular model for studies on AD (Jämsä et al., 2004). Furthermore, SH-SY5Y cells were characterized as neurosteroid-producing cells containing key neurosteroidogenic enzymes (Melcangi et al., 1993; Wozniak et al., 1998; Guarneri et al., 2000). In order to identify accurately concentrations to be considered as non-toxic or toxic for SH-SY5Y cells, we performed, prior to the comparative analysis of A $\beta$ <sub>1-42</sub> and A $\beta$ <sub>25-35</sub> effects on neurosteroid formation, cell viability assays in the presence or absence of nanomolar/physiological (100, 500 and 1000 nM) or high (12  $\mu$ M) doses of A $\beta$ <sub>1-42</sub> and A $\beta$ <sub>25-35</sub>.

## **Experimental procedures**

### *Chemicals and reagents*

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Glutamax, Penicillin/streptomycin, propylene glycol and MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). Fetal calf serum and horse serum were from Gibco (Basel, Switzerland).  $\beta$ -amyloid peptide fragment 25-35 (A $\beta$ <sub>25-35</sub>) and the full length  $\beta$ -amyloid peptide 1-42 (A $\beta$ <sub>1-42</sub>) were from Bachem AG (Bubendorf, Switzerland). Synthetic steroids including progesterone, pregnenolone (PREG), testosterone, 3 $\alpha$ -androstenediol and 17 $\beta$ -estradiol were purchased from Steraloids (Newport, RI, USA). Dichloromethane (DCM) was from Acros organics (Noisy Le Grand, France). Hexane and isopropanol were obtained from Fischer Bioblock Scientific (Illkirch, France). Tritiated steroids such as 7-<sup>3</sup>H(N)-pregnenolone ([<sup>3</sup>H]PREG), 1,2,6,7-<sup>3</sup>H(N)-progesterone, 1,2,6,7-

$^3\text{H}(\text{N})$ -testosterone and  $9,11\text{-}^3\text{H}(\text{N})$ - $3\alpha$ -androstenediol were obtained from PerkinElmer (Boston, MA, USA).

#### *Cell culture*

Human neuroblastoma SH-SY5Y cells were grown at  $37^\circ\text{C}$  under an atmosphere of 5%  $\text{CO}_2$  in DMEM supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum, 5% (v/v) heat-inactivated horse serum, 2mM Glutamax and 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin. Cells were passaged every 3-4 days and were used for pulse-chase experiments when they reached 80-90% confluence.

#### *MTT reduction assay*

To assess cell viability, MTT reduction assays were performed. SH-SY5Y cells were seeded at  $5 \times 10^4$  cells per well into 96-well plates and allowed to attach. After 48h, cells were maintained in the culture medium (controls) or exposed for 24h to preaggregated  $\text{A}\beta$  peptides diluted at different concentrations (100 nM, 500 nM, 1000 nM or 12  $\mu\text{M}$ ) in the medium. MTT (10  $\mu\text{l}$  of a 3.6 mM stock solution) was added to all wells and allowed to incubate in the dark at  $37^\circ\text{C}$  for 5h. After cell lysis, spectrophotometric measurement was performed at 595 nm to determine the cell viability. All MTT assays were repeated four times.

#### *Pulse chase experiments*

For each experiment, cells were incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 3h with 3 ml of culture medium containing 240 nM [ $^3\text{H}$ ]PREG supplemented with 0.66% propylene glycol in the presence or absence of test substances. The confluent cells were pretreated with 100 nM, 500 nM, 1000 nM or 12  $\mu\text{M}$  aggregated  $\text{A}\beta_{25-35}$  or  $\text{A}\beta_{1-42}$  during 24h and the peptide was also kept in the medium during the incubation with the radioactive steroid precursor. In all series of

experiments, the incubation with [ $^3\text{H}$ ]PREG was made in a water-saturated atmosphere (95% air, 5%  $\text{CO}_2$ ) which made it possible to maintain the pH at 7.4. At the end of the incubation period, the reaction was stopped by adding 1 ml of ice-cold DMEM and transferring the incubation medium in tubes into a cold water bath ( $0^\circ\text{C}$ ). Newly-synthesized neurosteroids released by the cells were extracted from the incubation medium three times with 2 ml of DCM and the organic phase was evaporated on ice under a stream of nitrogen. The dry extracts were redissolved in 2 ml of hexane and prepurified on Sep-Pak  $\text{C}_{18}$  cartridges (Waters Associates, Milford, MA, USA). Steroids were eluted with a solution made of 50% isopropanol and 50% hexane. The solvent was evaporated in a RC-10-10 Speed Vac Concentrator and the dry extracts were kept at  $-20^\circ\text{C}$  until HPLC analysis. The extraction efficiency was  $89 \pm 7\%$ .

#### *HPLC-Flo/One characterization of steroids*

The newly synthesized steroids extracted from the incubation medium already purified on Sep-Pak cartridges were characterized using a previously validated method which combines HPLC analysis and flow scintillation detection (Mensah-Nyagan et al., 1994; 1996; Patte-Mensah et al., 2003, 2005). Briefly, the prepurified extracts were analyzed by reversed-phase HPLC on a Gilson liquid chromatograph (322 pump, UV/VIS 156 detector, Unipoint system, Gilson, Middleton, WI, USA) equipped with a  $4.6 \times 250$  mm SymetryShield  $\text{C}_{18}$  column (Waters Associates) equilibrated with 100% hexane. The radioactive steroids were eluted at a flow rate of 0.5 ml/min using a gradient of isopropanol (0-60% over 65 min) including 5 isocratic steps at 0% (0-10 min), 1% (30-35 min), 2% (40-45 min), 30% (50-55 min) and 60% (60-65 min). The tritiated steroids eluted from the HPLC column were directly quantified with a flow scintillation analyzer (Radiomatic Flo/One-Beta A 500, Packard Instruments, Meriden, CT, USA) equipped with a Pentium IV PC computer for measurement

of the percentage of total radioactivity contained in each peak. Synthetic steroids used as reference standards were chromatographed under the same conditions as the extracts obtained from the cell incubation media and their elution positions were determined by ultraviolet absorption using a UV/VIS 156 detector (Gilson).

The elution positions of steroids change on analytic columns after the purification of a certain number of tissue extracts. Therefore, to optimize the characterization of newly-synthesized neurosteroids, synthetic tritiated neuroactive steroids including [ $^3\text{H}$ ]PREG, [ $^3\text{H}$ ]progesterone, [ $^3\text{H}$ ]testosterone, [ $^3\text{H}$ ]estradiol and [ $^3\text{H}$ ]3 $\alpha$ -androstenediol were also used as reference standards, chromatographed under the same conditions as the extracts and identified by their elution times with the Flo/One computer system before and after each extract analytic run.

#### *Protein assays, quantification of steroid biosynthesis and statistical analysis*

In a first step, the amount of radioactive steroids formed by the conversion of [ $^3\text{H}$ ]PREG was calculated as a percentage of the total radioactivity contained in all peaks resolved by the HPLC-Flo/One system, including [ $^3\text{H}$ ]PREG itself. Afterwards, the final amount or value used for the tables or chartbars was determined after normalization to the quantity of proteins contained in the dish of confluent cells which served for the pulse-chase experiment. The protein concentration was determined using a Bio-Rad Protein Assay kit (Bio-Rad, München, Germany) and bovine serum albumin as standard. Each value is the mean of four independent experiments. Statistical analysis was performed with the 5.1 version of Statistica software (Statsoft, Maison Alfort, France). One-way ANOVAs, followed by Tukey post-hoc comparisons were used.

## Results

### *Effects of A $\beta$ <sub>1-42</sub> and A $\beta$ <sub>25-35</sub> on human neuroblastoma cell viability*

These series of experiments were performed in order to determine physiological or non toxic concentrations of A $\beta$ <sub>1-42</sub> and A $\beta$ <sub>25-35</sub> to be tested on neurosteroidogenesis in SH-SY5Y cells. Because it is well demonstrated that A $\beta$  concentrations higher than 10  $\mu$ M induce cell death (Selkoe, 2001), we tested on cell viability the action of A $\beta$ <sub>1-42</sub> or A $\beta$ <sub>25-35</sub> at 100 nM, 500 nM or 1000 nM (1  $\mu$ M) to ensure that these concentrations are not toxic for SH-SY5Y cells. MTT assays revealed no SH-SY5Y cell death 24h after treatment with A $\beta$ <sub>1-42</sub> or A $\beta$ <sub>25-35</sub> at 100 nM, 500 nM or 1000 nM. At 12  $\mu$ M, A $\beta$ <sub>1-42</sub> and A $\beta$ <sub>25-35</sub> killed 68% and 49% of SH-SY5Y cells, respectively (Fig. 1).

### *Comparative analysis of the effects of A $\beta$ <sub>1-42</sub> and A $\beta$ <sub>25-35</sub> on neurosteroid biosynthesis*

Qualitative analysis performed with the HPLC-Flo/One system revealed that untreated (control) and treated SH-SY5Y cells with nanomolar/non-toxic (100, 500 or 1000 nM) or toxic (12  $\mu$ M) concentrations of A $\beta$ <sub>1-42</sub> or A $\beta$ <sub>25-35</sub> were all capable of converting the precursor [ $^3$ H]PREG into various [ $^3$ H]neurosteroids including [ $^3$ H]progesterone, [ $^3$ H]testosterone, [ $^3$ H]3 $\alpha$ -androstenediol and [ $^3$ H]estradiol (Fig. 2A-C). Quantitative assessments showed that only [ $^3$ H]progesterone and [ $^3$ H]estradiol formation was affected in SH-SY5Y cells by A $\beta$  peptides which did not modify the amounts of [ $^3$ H]testosterone and [ $^3$ H]3 $\alpha$ -androstenediol produced from [ $^3$ H]PREG (Table 1, Fig. 3-4). At nanomolar/non-toxic doses, both A $\beta$ <sub>1-42</sub> and A $\beta$ <sub>25-35</sub> inhibited [ $^3$ H]progesterone synthesis from [ $^3$ H]PREG but only A $\beta$ <sub>1-42</sub> was able to affect and stimulate [ $^3$ H]estradiol production (Fig. 3 and 4). At 12  $\mu$ M (toxic), A $\beta$ <sub>1-42</sub> effect inverted to inhibition of [ $^3$ H]estradiol production contrary to the stimulation observed with low doses (Fig. 4). Toxic A $\beta$ <sub>25-35</sub> concentration has remained ineffective in the modulation of



[<sup>3</sup>H]estradiol formation as previously observed with nanomolar doses (Fig. 4). [<sup>3</sup>H]progesterone production was inhibited by toxic A $\beta$ <sub>1-42</sub> and A $\beta$ <sub>25-35</sub> concentrations (Fig. 3).

## Discussion

Thanks to MTT reduction assays, we observed that nanomolar A $\beta$  concentrations do not induce human neuroblastoma SH-SY5Y cell death while high doses (12  $\mu$ M) are cytotoxic. In agreement with this observation, estimated concentrations of endogenous A $\beta$  intracellularly produced in wild type APP-transfected SH-SY5Y cells are within nanomolar to 1  $\mu$ M and no toxicity was observed in these cells as well as in PC12 cells overexpressing APP (Kögel et al., 2003; Schaeffer et al., 2006). The well-validated method combining pulse-chase experiments, HPLC analysis and flow-scintillation detection (Mensah-Nyagan et al., 1994, 1996; Patte-Mensah et al., 2003, 2005) allowed us to observe that, among numerous neurosteroids which can be produced from the precursor PREG in SH-SY5Y cells, only progesterone and estradiol formations were affected by A $\beta$ . Interestingly, while progesterone production was inhibited non-selectively by physiological and toxic concentrations of both A $\beta$ <sub>1-42</sub> and A $\beta$ <sub>25-35</sub>, estradiol formation was regulated only by the full-length pathogenic peptide A $\beta$ <sub>1-42</sub>. Indeed, nanomolar A $\beta$ <sub>1-42</sub> doses induced a stimulatory effect on estradiol synthesis which inverted to an inhibitory action at high A $\beta$ <sub>1-42</sub> concentration. Together, these results reveal the existence of a selective and amino-acid sequence dependent action of A $\beta$  on neurosteroid biosynthesis in SH-SY5Y cells. In support of this hypothesis, several studies have shown that A $\beta$ <sub>25-35</sub> induces different effects from those of A $\beta$ <sub>1-42</sub> in various experimental models (Mattson et al., 1997; Yao et al., 2002). For instance, it has been demonstrated that A $\beta$ <sub>1-42</sub>, but not A $\beta$ <sub>25-35</sub>, reproduced pathological features of AD such as microglia activation or acetylcholine esterase stimulation (Casal et al., 2002; Sáez-Valero et al., 2003). The

conversion of [ $^3\text{H}$ ]PREG into [ $^3\text{H}$ ]estradiol requires complementary activities of various enzymes such as  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (PREG conversion into progesterone), cytochrome P450c17 (progesterone conversion into androstenedione),  $17\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (androstenedione conversion into testosterone) and aromatase (testosterone conversion into estradiol). No difference was observed between  $\text{A}\beta_{1-42}$  and  $\text{A}\beta_{25-35}$  on progesterone synthesis from PREG, suggesting that  $\text{A}\beta$  may reduce  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity in SH-SY5Y cells. Moreover, the actions of  $\text{A}\beta_{1-42}$  and  $\text{A}\beta_{25-35}$  on cytochrome P450c17 and  $17\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase seem to be similar because no discrepancy was detected in the production of testosterone from PREG in SH-SY5Y cells exposed to  $\text{A}\beta_{1-42}$  or  $\text{A}\beta_{25-35}$ . In contrast,  $\text{A}\beta_{1-42}$  regulated dose-dependently estradiol formation while  $\text{A}\beta_{25-35}$  had no effect on this mechanism, suggesting that aromatase modulation depends on  $\text{A}\beta$  amino-acid sequence. In particular, the data suggest that aromatase activity may be controlled either by the N terminal sequence 1-24 or by the C terminal sequence 36-42 in agreement with the fact that the fragment 25-35 ( $\text{A}\beta_{25-35}$ ) had no effect on estradiol synthesis while the full-length sequence 1-42 ( $\text{A}\beta_{1-42}$ ) modulated this process. Furthermore, inversion of the stimulatory action of non-toxic  $\text{A}\beta_{1-42}$  doses on estradiol production to inhibition at high concentration, suggests the existence of a bimodal effect of  $\text{A}\beta_{1-42}$  on aromatase activity which may be determinant in the mediation of protective or degenerative effects of  $\text{A}\beta_{1-42}$  on nerve cells. Thus, increase of estradiol production in SH-SY5Y cells by physiological  $\text{A}\beta_{1-42}$  concentrations may protect them against death since several studies demonstrated neuroprotective effects of estrogens (Garcia-Segura et al., 2001). In contrast, decreased estradiol formation induced by high  $\text{A}\beta_{1-42}$  doses may contribute to SH-SY5Y cell degeneration and death. Consistently with this suggestion, we have recently observed decreased estradiol production in SH-SY5Y cells 12h after

treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a key mediator of A $\beta$  accumulation-induced cell death (Schaeffer et al., 2007).

Although accumulation of fibrillar deposits of A $\beta$  is considered as a key step in the pathogenesis of AD, interactions with cell membranes and signaling pathways coupled with A $\beta$  binding to nerve cells are not well understood. Therefore, intracellular cascades leading to the modulation of neurosteroidogenic enzymes in SH-SY5Y cells after their activation by A $\beta$  remain under the scope of speculation. However, a recent study, which investigated A $\beta$  binding to neuronal cell membranes by fluorescence correlation spectroscopy, suggested that A $\beta$  may kill cells via a receptor or target molecule (Hossain et al., 2007). Characterization of this receptor or target molecule will certainly help in the future to investigate intracellular cascades mediating the regulatory action exerted by A $\beta$  on the activities of neurosteroidogenic enzymes localized in SH-SY5Y cells (Melcangi et al., 1993; Wozniak et al., 1998; Guarneri et al., 2000). Nevertheless, the series of results described herein suggest that the selective targeting of neurosteroidogenic pathways in nerve cells may be an interesting possibility to explore for the development of novel strategies against neurodegenerative diseases.

### **Acknowledgements**

This work was supported by grants from Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, France) and Université Louis Pasteur (Strasbourg, France). VS was the recipient of a fellowship from the Neuroscience Network Neurex. Thanks to P. Piguet and S. Klipfel of Neurex.

## References

- Atwood, C.S., Obrenovich, M.E., Liu, T., Chan, H., Perry, G., Smith, M.A., Martins, R.N., 2003. Amyloid-beta: a chameleon walking in two worlds: a review of the trophic and toxic properties of amyloid-beta. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 43, 1-16.
- Baulieu, E.E., Robel, P., Schumacher, M. 1999. Contemporary endocrinology. Totowa, NJ: Humana Press.
- Casal, C., Serratos, J., Tusell, J.M., 2002. Relationship between beta-AP peptide aggregation and microglial activation. *Brain Res.* 928, 76-84.
- Garcia-Segura, L.M., Azcoitia, I., DonCarlos, L.L., 2001. Neuroprotection by estradiol. *Prog. Neurobiol.* 63, 29-60.
- Goedert, M., Spillantini, M.G., 2006. A century of Alzheimer's disease. *Science* 314, 777-781.
- Guarneri, P., Cascio, C., Piccoli, T., Piccoli, F., Guarneri, R., 2000. Human neuroblastoma SH-SY5Y cell line: neurosteroid-producing cell line relying on cytoskeletal organization. *J. Neurosci. Res.* 60, 656-665.
- Hossain, S., Grande, M., Ahmadkhanov, G., Pramanik, A., 2007. Binding of the Alzheimer amyloid beta-peptide to neuronal cell membranes by fluorescence correlation spectroscopy. *Exp. Mol. Pathol.* 82, 169-174.
- Jämsä, A., Hasslund, K., Cowburn, R.F., Bäckström, A., Vasänge, M. 2004. The retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor differentiated SH-SY5Y cell line as a model for Alzheimer's disease-like tau phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319, 993-1000.
- Kögel, D., Schomburg, R., Schürmann, T., Reimertz, C., König, H.G., Poppe, M., Eckert, A., Müller, W.E., Prehn, J.H., 2003. The amyloid precursor protein protects PC12 cells against endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J. Neurochem.* 87, 248-256.

- Koo, E.H., Park, L., Selkoe, D.J. 1993. Amyloid beta-protein as a substrate interacts with extracellular matrix to promote neurite outgrowth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 4748-4752.
- Kosik, K.S. 1992. Alzheimer's disease; a cell biological perspective. *Science* 256, 780-783.
- Mattson, M.P., Begley, J.G., Mark, R.J., Furukawa, K., 1997. Abeta25-35 induces rapid lysis of red blood cells: contrast with Abeta1-42 and examination of underlying mechanisms. *Brain Res.* 771, 147-153.
- Melcangi, R.C., Maggi, R., Martini, L., 1993. Testosterone and progesterone metabolism in the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 46, 811-818.
- Mensah-Nyagan, A.G., Feuilloley, M., Dupont, E., Do-Rego, J.L., Leboulenger, F., Pelletier, G., Vaudry, H., 1994. Immunocytochemical localization and biological activity of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the central nervous system of the frog. *J. Neurosci.* 14, 7306-7318.
- Mensah-Nyagan, A.G., Feuilloley, M., Do-Rego, J.L., Marcual, A., Lange, C., Tonon, M.C., Pelletier, G., Vaudry, H., 1996. Localization of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase and characterization of testosterone in the brain of the male frog. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 1423-1428.
- Miranda, S., Opazo, C., Larrondo, L.F., Munoz, F.J., Ruiz, F., Leighton, F., Inestrosa, N.C., 2000. The role of oxidative stress in the toxicity induced by amyloid beta-peptide in Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* 62, 633-648.
- Patte-Mensah, C., Kappes, V., Freund-Mercier, M.J., Tsutsui, K., Mensah-Nyagan, A.G., 2003. Cellular distribution and bioactivity of the key steroidogenic enzyme, cytochrome P450side chain cleavage, in sensory neural pathways. *J. Neurochem.* 86, 1233-1246.

- Patte-Mensah, C., Kibaly, C., Mensah-Nyagan, A.G., 2005. Substance P inhibits progesterone conversion to neuroactive metabolites in spinal sensory circuit: a potential component of nociception. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 9044-9049.
- Sáez-Valero, J., Fodero, L.R., White, A.R., Barrow, C.J., Small, D.H., 2003. Acetylcholinesterase is increased in mouse neuronal and astrocyte cultures after treatment with beta-amyloid peptides. *Brain Res.* 965, 283-286.
- Schaeffer, V., Patte-Mensah, C., Eckert, A., Mensah-Nyagan, A.G., 2006. Modulation of neurosteroid production in human neuroblastoma cells by Alzheimer's disease key proteins. *J. Neurobiol.* 66, 868-881.
- Schaeffer, V., Patte-Mensah, C., Eckert, A., Mensah-Nyagan, A.G., 2007. Effect of beta amyloid peptide 1-42 and oxidative stress on neurosteroid formation in human neuroblastoma cells. In Panzica, G.C., Gotti, S. (Eds.), *Abstract book of the 4<sup>th</sup> International Meeting Steroids and Nervous System*, Torino, pp 179.
- Selkoe, D.J., 2001. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* (81), 741-766.
- Stoffel-Wagner, B., 2001. Neurosteroid metabolism in the human brain. *Eur. J. Endocrinol.* 145, 669-679.
- Weill-Engerer, S., David, J.P., Sazdovitch, V., Liere, P., Eychenne, B., Pianos, A., Schumacher, M., Delacourte, A., Baulieu, E.E., Akwa, Y., 2002. Neurosteroid quantification in human brain regions: comparison between Alzheimer's and nondemented patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 5138-5143.
- Whitson, J.S., Selkoe, D.J., Cotman, C.W. 1989. Amyloid beta protein enhances the survival of hippocampal neurons in vitro. *Science* 243, 1488-1490.
- Wozniak, A., Hutchison, R.E., Morris, C.M., Hutchison, J.B., 1998. Neuroblastoma and Alzheimer's disease brain cells contain aromatase activity. *Steroids* 63, 263-267.

Yao, Z.X., Brown, R.C., Teper, G., Greeson, J., Papadopoulos, V., 2002. 22R-Hydroxycholesterol protects neuronal cells from beta-amyloid-induced cytotoxicity by binding to beta-amyloid peptide. *J. Neurochem.* 83, 1110-1119.

**Table 1.** Effects of nanomolar/non-toxic (100, 500 and 1000 nM) or toxic (12  $\mu$ M) concentrations of A $\beta$ <sub>1-42</sub> and A $\beta$ <sub>25-35</sub> on [<sup>3</sup>H]PREG conversion into [<sup>3</sup>H]progesterone (P) and [<sup>3</sup>H]estradiol (E<sub>2</sub>) in SH-SY5Y cells.

			Aβ <sub>25-35</sub>				Aβ <sub>1-42</sub>			
		Control	100 nM	500 nM	1000 nM	12 μM	100 nM	500 nM	1000 nM	12 μM
P (nM)	Samples	1.01	0.84	0.71	0.42	0.45	1.77	0.47	0.73	0.35
		1.07	0.47	0.41	1.03	0.48	0.93	0.52	1.54	0.37
		1.32	0.50	0.81	0.62	0.59	1.17	0.50	0.99	0.46
		1.45	0.32	0.68	0.63	0.65	0.89	0.63	0.95	0.51
	Mean ± SEM	1.21 ± 0.1	0.53 ± 0.11	0.65 ± 0.08	0.68 ± 0.13	0.54 ± 0.05	1.19 ± 0.20	0.53 ± 0.03	1.05 ± 0.17	0.42 ± 0.04
% effect vs controls		-56.2% **	-46.3% **	-43.8% *	-55.4% **	-1.6% NS	-56.2% *	-13.2% NS	-65.3% **	
E <sub>2</sub> (nM)	Samples	4.75	7.01	3.97	2.90	5.78	7.57	6.41	5.99	1.40
		5.54	5.55	7.20	5.53	6.75	7.21	6.49	7.29	1.64
		5.04	2.58	3.28	6.74	6.14	6.91	6.55	6.54	1.49
		5.87	4.71	5.70	3.07	7.15	6.63	8.17	7.01	1.73
	Mean ± SEM	5.30 ± 0.25	4.96 ± 0.93	5.04 ± 0.88	4.56 ± 0.94	6.45 ± 0.3	7.08 ± 0.20	6.91 ± 0.42	6.71 ± 0.28	1.56 ± 0.07
	% effect vs controls		-6.4% NS	-4.9% NS	-14% NS	+21.7% NS	+33.6% **	+30.4% **	+26.6% *	-70.6% ***

The values presented above were obtained from a complete series of experiments designated independent experiment 1. A total of four independent experiments were performed. In each independent experiment, 4 samples of control (untreated) SH-SY5Y cells and 4 samples of cells treated with each tested A $\beta$ <sub>1-42</sub> or A $\beta$ <sub>25-35</sub> concentration were analyzed. The values were obtained from experiments similar to that presented in Fig. 2. Each value was calculated as the relative amount of [<sup>3</sup>H]-neurosteroid compared with the total [<sup>3</sup>H]-labeled compounds resolved by HPLC-Flo/One characterization (x100) and was normalized to the protein concentration. Results were then expressed as the concentration of newly synthesized P or E<sub>2</sub>. The percent of effect vs controls expresses increase (+) or decrease (-) induced by A $\beta$  on P or E<sub>2</sub> formation in SH-SY5Y cells. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; NS, not significant.



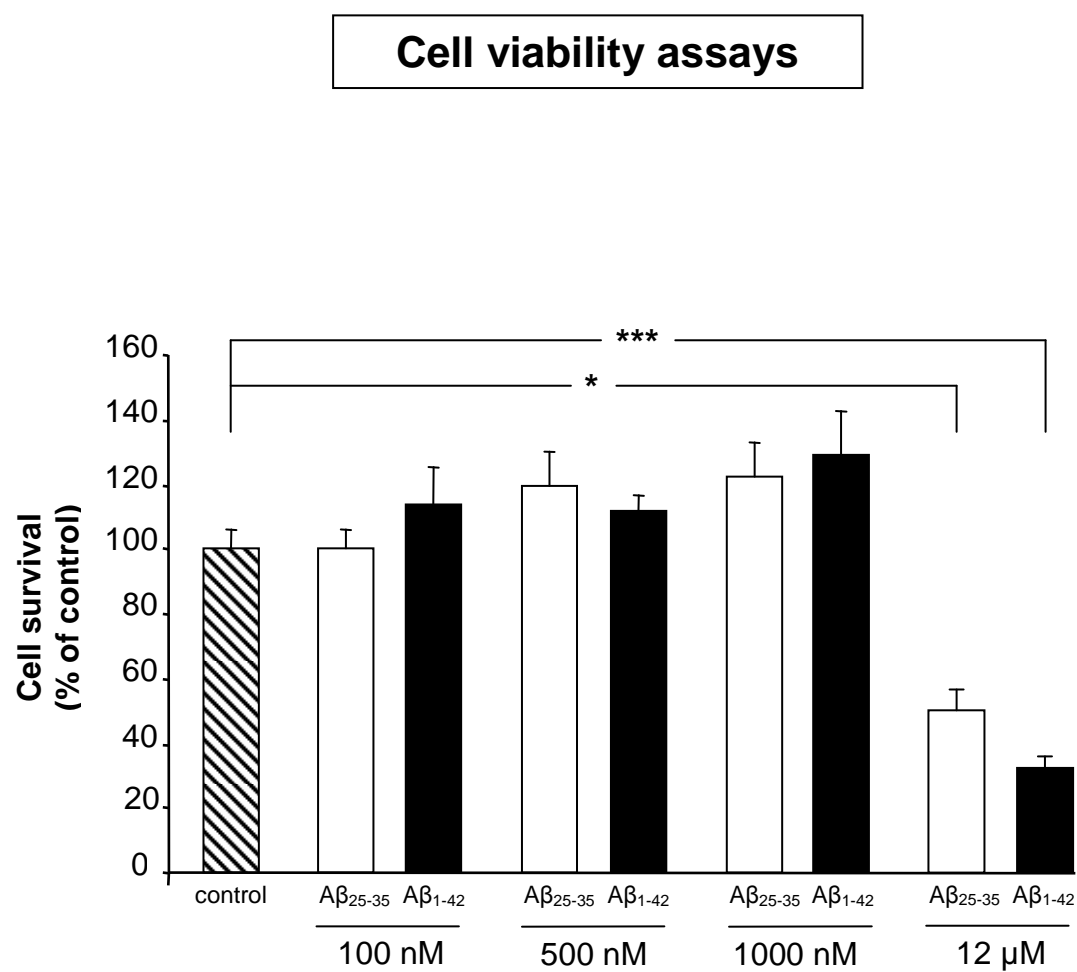
## Figure Legends

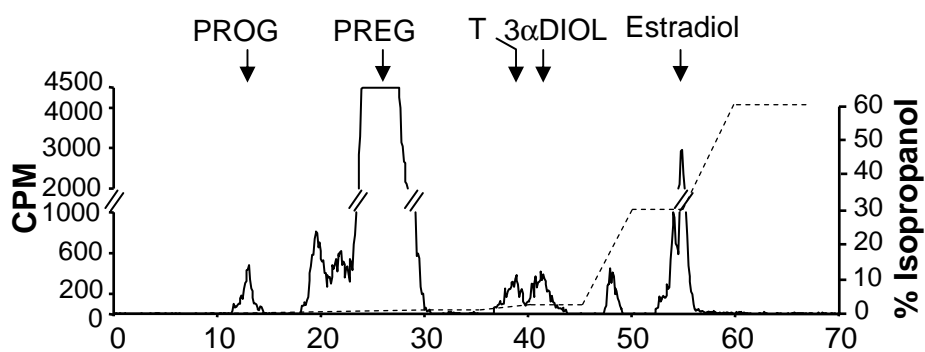
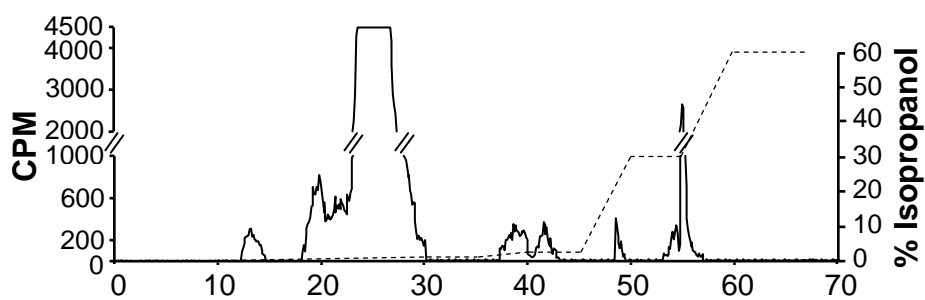
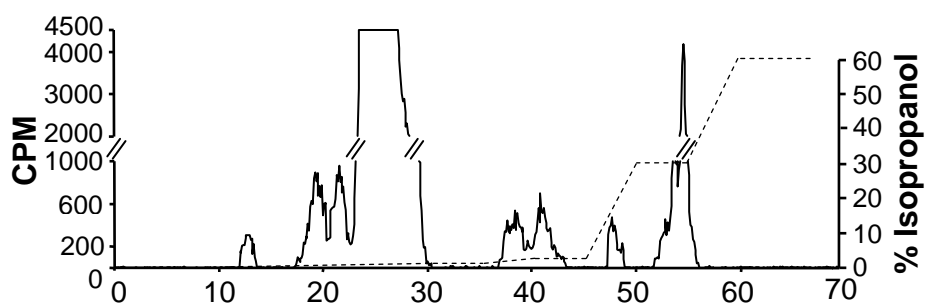
**Fig. 1.** Comparative analysis of the effects of  $A\beta_{1-42}$  and  $A\beta_{25-35}$  on SH-SY5Y cell viability. Neuroblastoma cells were exposed for 24h to nanomolar/physiological (100, 500 or 1000 nM) or high (12  $\mu$ M) concentrations of  $A\beta_{1-42}$  or  $A\beta_{25-35}$ . MTT reduction assays were used to determine the cell viability which was expressed as percent of control (untreated) cells. Each value is the mean  $\pm$  SEM of four independent experiments.

**Fig. 2.** HPLC-Flo/One characterization of [ $^3$ H]-neurosteroids produced, after a 3h incubation with [ $^3$ H]PREG, by controls (A) and SH-SY5Y cells treated with nanomolar concentrations of  $A\beta_{25-35}$  (B) or  $A\beta_{1-42}$  (C). The ordinate indicates the radioactivity measured in the HPLC eluent. The dashed line represents the gradient of secondary solvent (% isopropanol). The arrows indicate elution positions of standard steroids. PROG, progesterone; PREG, pregnenolone; T, testosterone; 3 $\alpha$ DIOL, 3 $\alpha$ -androstenediol.

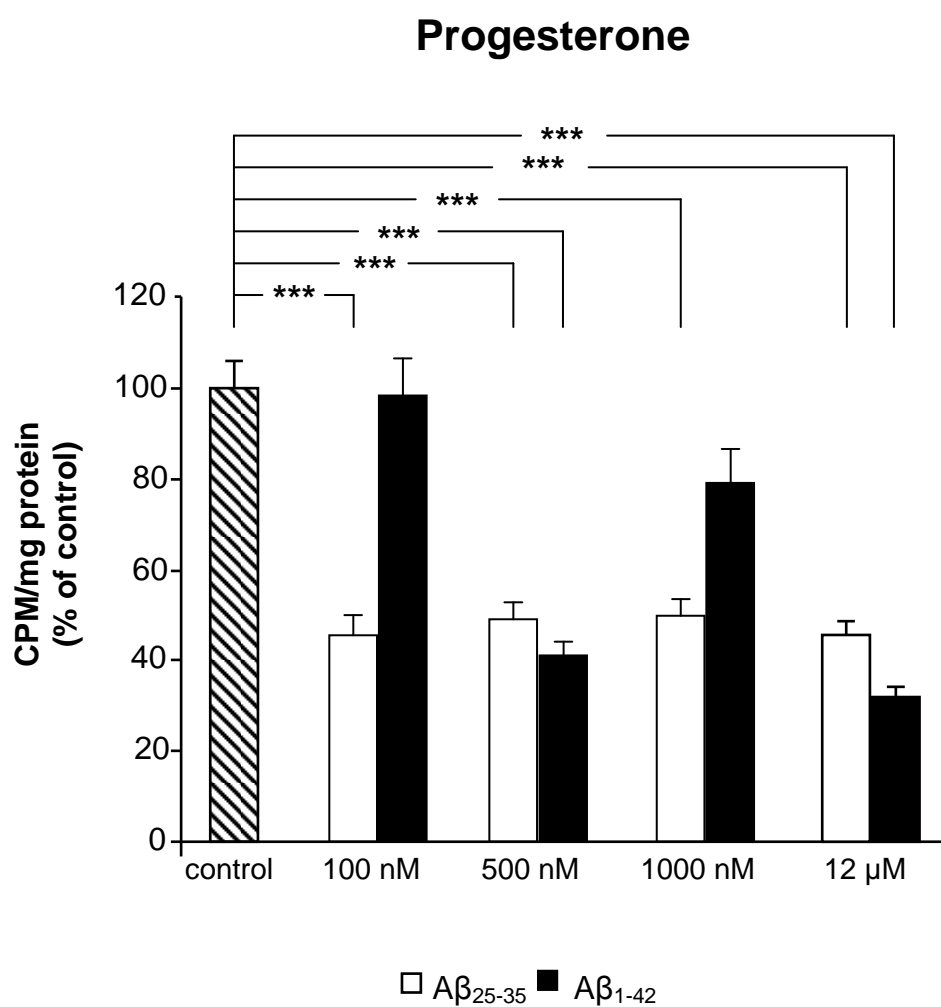
**Fig. 3.** Quantitative assessments of the effects of nanomolar/non-toxic (100, 500 and 1000 nM) and toxic (12  $\mu$ M) concentrations of  $A\beta_{1-42}$  and  $A\beta_{25-35}$  on [ $^3$ H]PREG conversion into [ $^3$ H]progesterone in SH-SY5Y cells. The chartbars represent the mean values of four independent experiments including experiment 1 presented in Table 1. Results were expressed as percentages of the amount of progesterone formed in control cells. \*\*\* $p < 0.001$ .

**Fig. 4.** Quantitative assessments of the effects of nanomolar/non-toxic (100, 500 and 1000 nM) and toxic (12  $\mu$ M) concentrations of  $A\beta_{1-42}$  and  $A\beta_{25-35}$  on [ $^3$ H]PREG conversion into [ $^3$ H]estradiol in SH-SY5Y cells. The chartbars represent the mean values of four independent experiments including experiment 1 presented in Table 1. Results were expressed as percentages of the amount of estradiol formed in control cells. \*\*\* $p < 0.001$ .

**Figure 1**

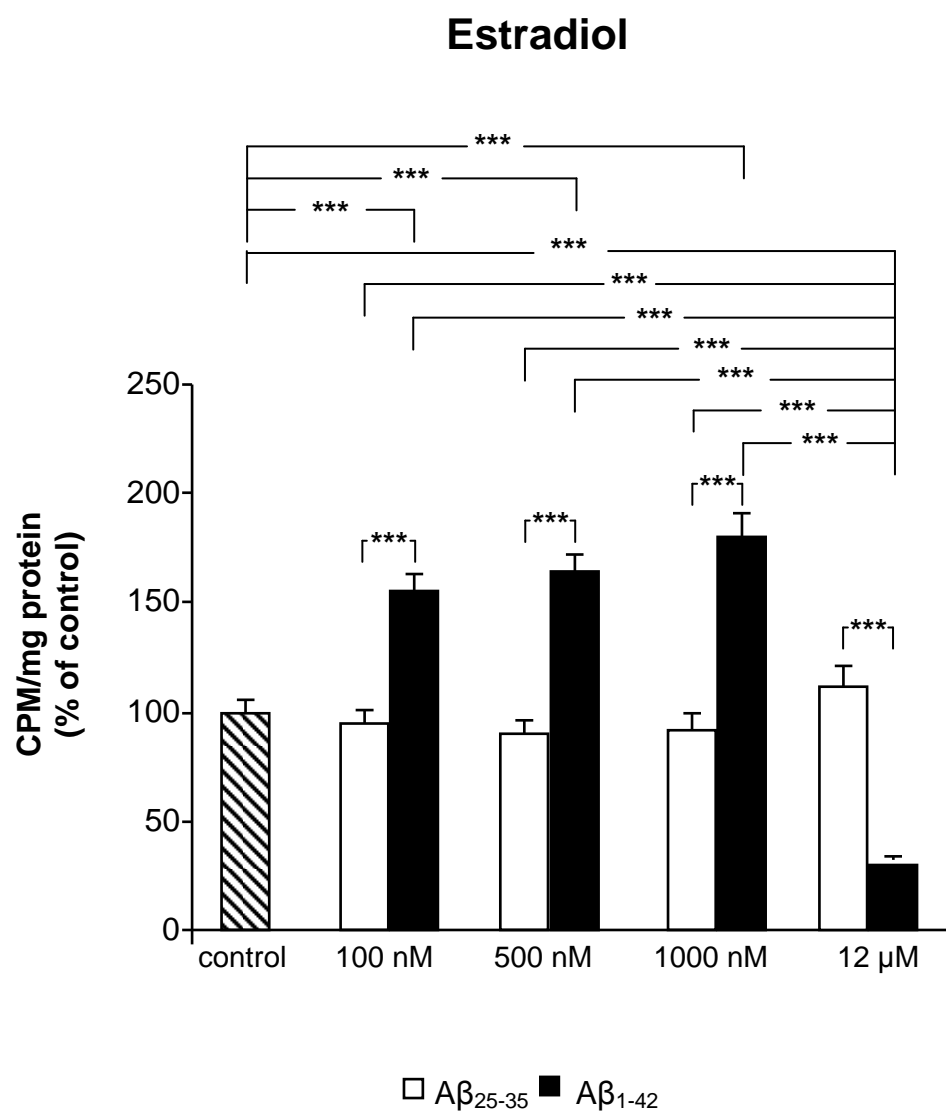
**Pulse-chase-HPLC-Flo/One analysis****(A)****Untreated Cells****(B)****A $\beta_{25-35}$  100 nM****(C)****A $\beta_{1-42}$  100 nM****Elution Time (min)****Figure 2**

## Quantitative assessment with Pulse-chase-HPLC-Flo/One-Protein assays



**Figure 3**

## Quantitative assessment with Pulse-chase-HPLC-Flo/One-Protein assays



**Figure 4**

### **III. Régulation sélective de la neurostéroïdogénèse dans les neuroblastomes humains en condition de stress oxydatif induit par le peroxyde d'hydrogène**

Le but du travail présenté dans ce chapitre est de vérifier si le processus de neurostéroïdogénèse fait partie des mécanismes cellulaires régulés de façon sélective dans les neuroblastomes humains en situation de stress induit par le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). En effet, l' $H_2O_2$  est un facteur étiologique impliqué dans l'induction de nombreuses pathologies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson, la sclérose latérale amyotrophique et la maladie d'Alzheimer (Dexter et coll. 1989 ; Yoritaka et coll. 1996 ; Smith et coll. 1997 ; Good et coll. 1998 ; Hensley et coll. 1998 ; Butterfield et coll. 2002 ; Andersen 2004). En particulier, l' $H_2O_2$  est bien connu comme étant capable de relayer les effets neurodélétères provoqués par l'accumulation d'A $\beta$  dans le cerveau des patients Alzheimer (Behl et coll. 1994 ; Schubert et coll. 1995 ; Yatin et coll. 1999 ; Miranda et coll. 2000 ; Tamagno et coll. 2003 ; Tabner et coll. 2005). Par ailleurs, bien que la neurostéroïdogénèse ait été mise en évidence dans le système nerveux de plusieurs espèces animales, très peu de choses sont encore connues sur sa régulation, en particulier sur les facteurs clés interagissant avec la biosynthèse des neurostéroïdes dans des conditions physiopathologiques (Baulieu et coll. 1999 ; Mensah-Nyagan et coll. 1999 ; Patte-Mensah et coll. 2006). Cette situation complique sérieusement l'exploitation des neurostéroïdes pour le développement de stratégies thérapeutiques neuroprotectrices. Ainsi, pour savoir si la biosynthèse des neurostéroïdes est sélectivement régulée pendant les processus physiopathologiques évoquant un stress oxydatif, nous avons combiné plusieurs approches telles que le *MTT reduction assay* pour évaluer la viabilité cellulaire, la transcription inverse couplée à la *polymerase chain reaction* en temps réel (rt-RT-PCR) pour détecter l'action du  $H_2O_2$  sur l'expression des enzymes de la

neurostéroïdogénèse, le pulse-chase, l'HPLC et le Flo/One pour caractériser les neurostéroïdes synthétisés dans les neuroblastomes SH-SY5Y en situation physiologique et en condition de stress oxydatif.

### **III.1. Effet du stress oxydatif induit par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la viabilité cellulaire**

Grâce au *MTT reduction assay*, nous avons réalisé des études cinétiques et dose-dépendantes qui ont permis d'établir que pour provoquer une mort cellulaire significative, il est nécessaire d'utiliser l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à la concentration de 1 mM avec un temps d'incubation des neuroblastomes équivalent à 24 ou 48h. Les pourcentages de mort cellulaire sont de 83% et 97% respectivement à 24 et 48h après le traitement des cellules SH-SY5Y avec l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 1 mM.

### **III.2. Effet du stress oxydatif sur la biosynthèse des neurostéroïdes**

Les expériences de pulse-chase combinées aux analyses HPLC et Flo/One montrent que sur l'ensemble des voies biochimiques convertissant la [<sup>3</sup>H]PREG en divers neurostéroïdes tritiés, seule la biosynthèse d' [<sup>3</sup>H]œstradiol est sélectivement inhibée dans les cellules SH-SY5Y 12h, 24h ou 48h après leur traitement avec l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Le stress oxydatif n'a entraîné aucune modification des taux de [<sup>3</sup>H]progesterone, [<sup>3</sup>H]testosterone et [<sup>3</sup>H]3α-androstanediol néosynthétisés à partir de la [<sup>3</sup>H]PREG.

### **III.3. Effet du stress oxydatif sur l'expression du gène de l'aromatase**

La transcription inverse couplée à la *polymerase chain reaction* en temps réel a révélé une répression du gène codant l'aromatase (enzyme clé de synthèse de l'œstradiol) dans les cellules SH-SY5Y à partir d'un délai de 12h après le traitement avec l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Une diminution de 95%, 91% ou 99% de la quantité de transcrits codant l'aromatase a été observée dans les cellules SH-SY5Y respectivement à 12h, 24h ou 48h après le début du stress oxydatif induit par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM).

### **III.4. Effet protecteur de l'œstradiol contre la mort cellulaire induite par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Le prétraitement des neuroblastomes avec l'œstradiol à 100 nM les protège contre la mort cellulaire induite par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, suggérant que la biosynthèse d'œstradiol endogène est cruciale pour la viabilité des cellules SH-SY5Y. En absence de stress induit par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, l'œstradiol n'entraîne pas d'augmentation de la densité cellulaire basale. L'ensemble de ces données indique que le neurostéroïde œstradiol, qui n'exerce pas d'action proliférative sur les cellules SH-SY5Y, est capable de les protéger contre la mort cellulaire induite par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Les figures et illustrations relatives aux résultats décrits dans le chapitre III sont incluses dans l'article ci-joint sous presse pour Neuroscience. Cet article contient également des détails et informations complémentaires sur les travaux abordés dans ce chapitre.**



## **SELECTIVE REGULATION OF NEUROSTEROID BIOSYNTHESIS IN HUMAN NEUROBLASTOMA CELLS UNDER HYDROGEN PEROXIDE-INDUCED OXIDATIVE STRESS CONDITION**

Véronique Schaeffer<sup>a</sup>, Christine Patte-Mensah<sup>a</sup>, Anne Eckert<sup>b</sup> and Ayikoe G. Mensah-Nyagan<sup>a\*</sup>.

<sup>a</sup> Equipe Stéroïdes et Système Nociceptif, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Centre National de la Recherche Scientifique/Université Louis Pasteur, 21 rue René Descartes, 67 084 Strasbourg Cedex, France.

<sup>b</sup> Neurobiology Research Laboratory, Psychiatric University Clinic, Wilhelm Klein-Strasse 27, CH-4025 Basel, Switzerland.

\* Correspondence should be addressed to Prof. A.G. Mensah-Nyagan, Equipe Stéroïdes et Système Nociceptif, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Centre National de la Recherche Scientifique/Université Louis Pasteur, 21 rue René Descartes, 67084 Strasbourg Cedex, France. Tel: (33) 390 24 14 38, Fax: (33) 388 61 33 47; E-Mail: [gmenhah@neurochem.u-strasbg.fr](mailto:gmenhah@neurochem.u-strasbg.fr).

*Abbreviations:* AD, Alzheimer's disease; DCM, dichloromethane; DHEA, dehydroepiandrosterone; DHEAS, dehydroepiandrosterone sulphate; 3 $\alpha$ DIOL, 3 $\alpha$ -androstenediol; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium; Flo/One, continuous flow scintillation detection; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hydrogen peroxide; HPLC, high performance liquid chromatography ; MTT, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide ; 17OHPROG, 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone ; PREG, pregnenolone; PREGS, pregnenolone sulphate; PROG, progesterone; rt-RT-PCR, reverse transcription followed by real-time polymerase chain reaction; ROS, reactive oxygen species; T, testosterone.

## Abstract

Neurosteroid biosynthesis is demonstrated in many species but key factors interacting with neurosteroidogenesis under pathophysiological conditions are unknown. Hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )-induced oxidative stress is an etiological factor involved in several disorders. We hypothesized that, if neurosteroidogenesis is a pivotal mechanism for nerve cell protection or viability, it might be selectively regulated under oxidative stress condition. To check our hypothesis, we investigated  $\text{H}_2\text{O}_2$  effects on neurosteroidogenesis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. Pulse-chase, high performance liquid-chromatography and flow-scintillation analyses showed that, along neurosteroidogenic pathways converting pregnenolone into various neurosteroids, only estradiol synthesis selectively decreased in SH-SY5Y cells after  $\text{H}_2\text{O}_2$ -treatment. Testosterone conversion into estradiol was also inhibited by  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Real-time RT-PCR revealed aromatase gene repression in SH-SY5Y cells 12h after the oxidative stress onset. Consistently, viability assays showed that chronic inhibition of aromatase activity by letrozole killed neuroblastoma cells. A 12h-pretreatment of SH-SY5Y cells with estradiol was protective against  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced death. In addition, estradiol was also capable of rescuing markedly neuroblastoma cells from letrozole-evoked death. Altogether, these results suggest that endogenous estradiol formation is pivotal for SH-SY5Y cell viability. Serum deprivation-evoked stress, which also killed SH-SY5Y cells, unaffected neurosteroidogenesis, indicating that inhibitory effect on neuroprotective-neurosteroid estradiol biosynthesis is specific for  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced stress. Selective targeting of neurosteroidogenic pathways may therefore constitute an interesting strategy against  $\text{H}_2\text{O}_2$ -evoked neurodegenerative processes.

**Key words:** aromatase gene expression; neurosteroidogenesis regulator; steroid and nervous system; neural disorder; nerve cell viability; Real Time PCR

Investigations aiming to establish a link between neural diseases and steroid hormones have been launched several years ago since steroids, which exert pleiotropic effects in the body, regulate numerous biological mechanisms (Sunderland et al., 1989; Leblhuber et al., 1993; Carlson et al., 1999). Many attempts were made to correlate plasma levels of neuroactive steroids such as cortisol, dehydroepiandrosterone (DHEA) or its sulfated derivative (DHEAS) with severity of symptoms in Alzheimer's disease (AD) patients but these attempts generated contradictory results hardly exploitable (Davis et al., 1985; Weiner et al., 1993; Legrain et al., 1995; Näsman et al., 1995; Murialdo et al., 2000; Rasmuson et al., 2002). Controversial data were also provided by studies which investigated the possible relationship between plasma concentrations of DHEA or cortisol and the development of schizophrenic symptoms or the gait dynamics in Parkinson's disease (Bellomo et al., 1991; Charlett et al., 1998; Harris et al., 2001; Shirayama et al., 2002; Ritsner et al., 2004, 2006; di Michele et al., 2005; Gallagher et al., 2007). Therefore, it appeared that plasma levels of steroid hormones produced by peripheral glands may not be a good index reflecting accurately the potential risk or the degree of activation of endogenous processes leading to the development of neuropathological disorders. To answer this question, a series of studies performed over the last decade have measured the levels of DHEA, DHEAS, pregnenolone (PREG) and pregnenolone sulfate (PREGS) in the cerebrospinal fluid of controls, AD or vascular dementia patients and in post mortem brain (Weill-Engerer et al., 2002; Kim et al., 2003). These studies, which observed a good correlation between decreased DHEAS or PREGS levels and AD or vascular dementia, suggested that the concentrations of neurosteroids (steroids directly synthesized in the nervous system) might be more suitable than the levels of peripheral steroids to establish a causal link with neuropathological diseases. In support of this hypothesis, we have recently shown that the overexpression of key proteins involved in AD interferes with neurosteroidogenesis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells, suggesting that

various pathogenic factors may induce neurodegenerative disorders through a down-regulation of neuroprotective steroid biosynthesis in nerve cells (Schaeffer et al., 2006).

Among the pivotal pathogenic processes involved in the etiology of neural diseases is oxidative stress induced by excessive amounts of reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide or  $H_2O_2$  (Beal, 1995; Mizuno et al., 1998; Giasson et al., 2002; Andersen, 2004). Post mortem brain tissues from patients with Parkinson's disease, AD and amyotrophic lateral sclerosis clearly display increased indices of ROS in affected brain regions (Dexter et al., 1989; Yoritaka et al., 1996; Smith et al., 1997; Good et al., 1998; Hensley et al., 1998; Butterfield et al., 2002; Andersen, 2004). Oxidative cell injury is also involved in the pathophysiology of schizophrenia (Lohr et al., 1990; Mahadik and Mukherjee, 1996; Reddy and Yao, 1996; Khan et al., 2002). In the ROS family,  $H_2O_2$  is well-known to mediate brain damages caused by the accumulation of  $\beta$ -amyloid peptide in AD (Behl et al., 1994; Schubert et al., 1995; Yatin et al., 1999; Miranda et al., 2000; Tamagno et al., 2003; Tabner et al., 2005). Moreover,  $H_2O_2$ -evoked oxidative stress has also been identified as a pivotal mechanism mediating cytotoxic action of neuropathologic factors such as  $\alpha$ -synuclein, 6-hydroxydopamine and the prion protein (Soto-Otero et al., 2000; Turnbull et al., 2001, 2003; Andersen, 2004). Therefore, we made the hypothesis that, if the process of neurosteroid biosynthesis is a pivotal mechanism intervening in the protection or viability of nerve cells, it might be regulated or significantly affected under oxidative stress conditions. Indeed, although the process of neurosteroidogenesis has been evidenced in several animal species, little is known about its regulation; in particular, the key factors interacting with neurosteroid biosynthesis under pathophysiological conditions are totally unknown (Baulieu et al., 1999; Mensah-Nyagan et al., 1999; Patte-Mensah et al., 2006). This situation seriously hampers the exploitation of neurosteroids or pharmacological regulators of neurosteroidogenic pathways to develop therapeutic strategies against neural disorders.

To determine whether or not the process of neurosteroidogenesis belongs to cellular mechanisms selectively regulated during oxidative stress-induced neural disorders, we decided to investigate the effect of  $\text{H}_2\text{O}_2$  on neurosteroid biosynthesis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. This cell line, which displays neuronal phenotype and properties, is a representative model for biochemical investigations of neurodegenerative diseases (Li et al., 1996; Misonou et al., 2000; Olivieri et al., 2002; Jämsä et al., 2004). SH-SY5Y cells were also characterized as neurosteroid-producing cells containing key neurosteroidogenic enzymes (Melcangi et al., 1993; Wozniak et al. 1998; Guarneri et al., 2000). To tackle the question in an effective manner, we combined several approaches including MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) reduction assays to assess cell viability, reverse transcription followed by real-time polymerase chain reaction (rt-RT-PCR) to detect the impact of  $\text{H}_2\text{O}_2$  on neurosteroidogenic enzyme gene expression, pulse-chase experiments, high performance liquid chromatography (HPLC) and flow scintillation detection (Flo/One) to characterize neurosteroid newly-synthesized in neuroblastoma cells under physiological and  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced oxidative stress conditions.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Chemicals and reagents

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Glutamax, Penicillin/streptomycin, propylene glycol,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $17\beta$ -estradiol and MTT were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). Fetal calf serum and horse serum were from Gibco (Basel, Switzerland). Synthetic steroids including pregnenolone (PREG), progesterone (PROG),  $17\alpha$ -hydroxyprogesterone ( $17\text{OH}$ PROG), testosterone (T),  $3\alpha$ -androstenediol ( $3\alpha$ DIOL) were purchased from Steraloids (Newport, RI, USA). Dichloromethane (DCM) was from Acros organics (Noisy Le

Grand, France). Hexane and isopropanol were obtained from Fischer Bioblock Scientific (Illkirch, France). Tritiated steroids such as 7-<sup>3</sup>H(N)-pregnenolone ([<sup>3</sup>H]PREG), 1,2,6,7-<sup>3</sup>H(N)-progesterone ([<sup>3</sup>H]PROG), 1,2,6,7-<sup>3</sup>H(N)-testosterone ([<sup>3</sup>H]T) and 9,11-<sup>3</sup>H(N)-3 $\alpha$ -androstenediol ([<sup>3</sup>H]3 $\alpha$ DIOL) were obtained from PerkinElmer (Boston, MA, USA). 17 $\alpha$ -Hydroxy-[1,2,6,7-<sup>3</sup>H]-progesterone ([<sup>3</sup>H]17OHPROG) was purchased from Amersham (Piscataway, NJ, USA). Letrozole was a generous gift from Dr D. Evans of Novartis (Basel, Switzerland).

### **Cell culture**

Human neuroblastoma SH-SY5Y cells were grown at 37°C under an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in DMEM supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum, 5% (v/v) heat-inactivated horse serum, 2mM Glutamax and 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (normal culture medium). Cells were passaged every 3-4 days and were used for pulse-chase experiments when they reached 80-90% confluence.

### **MTT reduction assay**

To assess cell viability, MTT reduction assays were performed. SH-SY5Y cells were seeded at 5  $10^4$  cells per well into 96-well plates and allowed to attach. After 48h, SH-SY5Y cells were incubated in the following conditions for evaluation of the effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress, serum deprivation-evoked stress or letrozole (aromatase inhibitor) on cell viability: (i) normal culture medium containing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at various concentrations (for 3h, 6h, 12h, 24h or 48h in order to determine effective H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations and incubation times inducing the death of a significant percentage of cells); (ii) serum deprived medium for 48h; (iii) normal culture medium containing letrozole at various concentrations (from 0.1 to 8  $\mu$ M) for 4 days; and (iv) normal culture medium alone for different times (controls).

To assess the neuroprotective ability of estradiol, SH-SY5Y cells were pretreated with the normal culture medium alone or the normal medium containing estradiol at 10 or 100 nM. After the pretreatment, each one of these categories of SH-SY5Y cells was incubated for 24h or 48h with the normal medium (NT<sub>24</sub> and NT<sub>48</sub>), the normal medium containing estradiol alone at 10 nM (groups [E<sub>2</sub>10]<sub>24</sub> and [E<sub>2</sub>10]<sub>48</sub>) or 100 nM (groups [E<sub>2</sub>100]<sub>24</sub> and [E<sub>2</sub>100]<sub>48</sub>), the normal medium with only H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 1 mM (groups [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sub>24</sub> and [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sub>48</sub>) or the normal medium containing both H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) and estradiol at 10 nM (groups [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+E<sub>2</sub>10]<sub>24</sub> and [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+E<sub>2</sub>10]<sub>48</sub>) or 100 nM (groups [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+E<sub>2</sub>100]<sub>24</sub> and [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+E<sub>2</sub>100]<sub>48</sub>). MTT (10 µl of a 3.6 mM stock solution) was added to all wells and allowed to incubate in the dark at 37°C for 5h. After cell lysis, spectrophotometric measurement was performed at 595 nm to determine the cell viability. All MTT assays were repeated four times.

To investigate the protective effects of estradiol against cell death induced by letrozole, SH-SY5Y cells were directly incubated for 4 days with letrozole (4, 6 or 8 µM) in the presence of estradiol (100 nM). MTT assays were also used as described above to assess the cell viability.

### **Pulse-chase experiments**

In a first step, confluent SH-SY5Y cells were treated with the serum-deprived medium during 48h or the normal culture medium containing 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during 3h, 6h, 12h, 24h or 48h. Control or unstressed cells were kept in the normal culture medium alone. After the stress procedure, dead floating cells were discarded from the dishes and only alive adherent SH-SY5Y cells were incubated at 37°C for 3h with 240 nM [<sup>3</sup>H]PREG (supplemented with 0.66% propylene glycol) diluted either in 3 ml of serum-deprived medium, in 3 ml of normal culture medium containing 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or in 3 ml of normal culture medium alone. In a series of experiments, the precursor [<sup>3</sup>H]PREG was replaced by 240 nM [<sup>3</sup>H]T (supplemented with 0.66% propylene glycol) diluted in 3 ml of normal culture medium containing 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or



in 3 ml of normal culture medium alone. In all series of experiments, the incubation with the tritiated precursor [ $^3\text{H}$ ]PREG or [ $^3\text{H}$ ]T was made in a water-saturated atmosphere (95% air, 5%  $\text{CO}_2$ ) which made it possible to maintain the pH at 7.4. At the end of the incubation period, the reaction was stopped by adding 1 ml of ice-cold DMEM and transferring the incubation medium in tubes into a cold water bath ( $0^\circ\text{C}$ ). Newly-synthesized neurosteroids released by the cells were extracted from the incubation medium three times with 2 ml of DCM and the organic phase was evaporated on ice under a stream of nitrogen. The dry extracts were redissolved in 2 ml of hexane and prepurified on Sep-Pak  $\text{C}_{18}$  cartridges (Waters Associates, Milford, MA, USA). Steroids were eluted with a solution made of 50% isopropanol and 50% hexane. The solvent was evaporated in a RC-10-10 Speed Vac Concentrator and the dry extracts were kept at  $-20^\circ\text{C}$  until HPLC analysis. The extraction efficiency was  $89 \pm 7\%$ .

#### **HPLC-Flo/One characterization of steroids**

The newly-synthesized steroids extracted from the incubation medium already purified on Sep-Pak cartridges were characterized using a previously validated method which combines HPLC analysis and flow-scintillation detection (Mensah-Nyagan et al., 1994, 1996a,b; Patten-Mensah et al., 2003, 2004, 2005; Kibaly et al., 2005). Briefly, the prepurified extracts were analyzed by reversed-phase HPLC on a Gilson liquid chromatograph (322 pump, UV/VIS 156 detector, Unipoint system, Gilson, Middleton, WI, USA) equipped with a  $4.6 \times 250$  mm SymetryShield  $\text{C}_{18}$  column (Waters Associates) equilibrated with 100% hexane. The radioactive steroids were eluted at a flow rate of 0.5 ml/min using a gradient of isopropanol (0-60% over 65 min) including 5 isocratic steps at 0% (0-10 min), 1% (30-35 min), 2% (40-45 min), 30% (50-55 min) and 60% (60-65 min). The tritiated steroids eluted from the HPLC column were directly quantified with a flow-scintillation analyzer (Radiomatic Flo/One-Beta

A 500, Packard Instruments, Meriden, CT, USA) equipped with a Pentium IV PC computer for measurement of the percentage of total radioactivity contained in each peak. Synthetic steroids used as reference standards were chromatographed under the same conditions as the extracts obtained from the cell incubation media and their elution positions were determined by ultraviolet absorption using a UV/VIS 156 detector (Gilson).

The elution positions of steroids change on analytic columns after the purification of a certain number of tissue extracts. Therefore, to optimize the characterization of newly-synthesized neurosteroids, synthetic tritiated neuroactive steroids including [ $^3\text{H}$ ]PREG, [ $^3\text{H}$ ]PROG, [ $^3\text{H}$ ]17OHPROG, [ $^3\text{H}$ ]T, [ $^3\text{H}$ ]estradiol and [ $^3\text{H}$ ]3 $\alpha$ DIOL were also used as reference standards, chromatographed under the same conditions as the extracts and identified by their elution times with the Flo/One computer system before and after each extract analytic run.

### **Protein assays and quantification of steroid biosynthesis**

Firstly, the amount of radioactive steroids formed by the conversion of [ $^3\text{H}$ ]PREG (or [ $^3\text{H}$ ]T) was calculated as a percentage of the total radioactivity contained in all peaks resolved by the HPLC-Flo/One system, including [ $^3\text{H}$ ]PREG (or [ $^3\text{H}$ ]T) itself. Afterwards, the final amount or value used for the chartbars was determined after normalization to the quantity of proteins contained in the dish of confluent cells which served for the pulse-chase experiment. The protein concentration was determined using a Bio-Rad Protein Assay kit (Bio-Rad, München, Germany) and bovine serum albumin as standard. Each value is the mean of four independent experiments.

### **Reverse Transcription and Real-Time PCR**

The extraction kit RNeasy Plus (Qiagen, Courtaboeuf, France) was used according to the manufacturer's instructions for the extraction of total RNA from the SH-SY5Y neuroblastoma

cells and the testis. The quality of RNA was electrophoretically determined by ethidium bromide-stained agarose gels and by optical density (OD) absorption ratio  $OD_{260nm} / OD_{280nm} > 1.7$ . Reverse transcription (RT) of 200 ng total RNA was performed using the Reverse Transcriptase Core kit (Eurogentec, Seraing, Belgium) in three steps of 10 min at 25°C, 30 min at 48°C and 5 min at 95°C. The reaction system for first-strand cDNA was as follows: 12.5U Moloney murine leukemia virus, 2.5  $\mu$ M random nonamer, 500  $\mu$ M dNTP mixture in a final volume of 10  $\mu$ l. Real-Time PCRs were performed using a LightCycler (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). The specific primer sequences for human aromatase were: forward, 5'-TGCAGGAAAGTACATCGCCAT-3' (nucleotides 126-146) and reverse, 5'-TCCTTGCAATGTCTTCACGTG-3' (nucleotides 210-190) (Ishunina et al., 2005). The primers for the housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were: forward, 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' (nucleotides 3,069-3,088) and reverse, 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' (nucleotides 3,624-3,605) (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA). rt-PCR was performed in a total volume of 20  $\mu$ l including 40 ng cDNA, 100 nM specific primers, 10  $\mu$ l QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen, Courtaboeuf, France) containing Taq polymerase, dNTP,  $MgCl_2$ , and SYBR Green I dye. A negative control without cDNA template (called water) was run simultaneously with every assay. Standard curves were obtained by using serial dilution of testis cDNA. The amplification program consisted of one denaturing step of 10 min at 95°C, followed by different amplification cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. Amplifications were followed by melting-curve analysis to ensure the specificity of rt-PCR products and the absence of non-specific products. Based on analyses and calculation integrating adequate standard curves, levels of transcripts encoding aromatase and GAPDH were determined in samples from gonads and neuroblastoma cells using the LightCycler Software available in the rt-RT-PCR system. The concentration of aromatase mRNA in each sample was calculated

after normalization of rt-RT-PCR aromatase product to GAPDH. For each sample, the rt-RT-PCR experiment was repeated four times. The results are expressed as mean  $\pm$  SEM.

### **Statistical analysis**

All values presented are the mean  $\pm$  SEM of four different experiments. Statistical analysis was performed with the 5.1 version of Statistica software (Statsoft, Maison Alfort, France). Student's *t* test was used for comparisons in pairs while one- or two-way ANOVAs followed by Tukey post-hoc were applied for multi-parameter analyses.

## **RESULTS**

### **Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress on SH-SY5Y cell viability**

A time and dose-dependent study was performed to investigate the action of the oxidative stressor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on human neuroblastoma cell viability. The range of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations tested was from 0 to 1000  $\mu$ M or 1 mM and several incubation times (3h, 6h, 12h, 24h and 48h) were used within a period covering 2 days (Fig. 1A). The effective concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inducing the death of a significant number of SH-SY5Y cells was 1 mM (Fig. 1A). Time-course investigations revealed that, until 12h after the treatment of SH-SY5Y cells with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM), no significant cell death was detected. At 24h after the onset of the oxidative stress with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM), 83% of neuroblastoma cells died (Fig. 1A). The percentage of cell death reached 97% 48h after the treatment of SH-SY5Y cells with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 1 mM (Fig. 1A).

### **Effect of serum deprivation-induced stress on SH-SY5Y cell viability**

MTT reduction assays revealed that a 48h treatment of confluent SH-SY5Y cells with serum-deprived medium induced the death of 42% of cells compared to control cells which were incubated with the normal culture medium (Fig. 1B).

### **Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress on neurosteroid biosynthesis in SH-SY5Y cells**

To investigate neurosteroid production in stressed neuroblastoma cells, dead floating cells were discarded after the oxidative stress procedure. Incorporation of the tritiated steroid precursor ([<sup>3</sup>H]PREG) was performed only into living SH-SY5Y cells, for example into 17% or 3% of initial number of cells remaining alive, respectively, at 24h or 48h after treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 1A). Qualitative analysis with the HPLC-Flo/One system showed that untreated and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stressed cells were capable of converting [<sup>3</sup>H]PREG into various metabolites including [<sup>3</sup>H]progesterone, [<sup>3</sup>H]T, [<sup>3</sup>H]3 $\alpha$ -androstenediol and [<sup>3</sup>H]estradiol (Fig. 2). Quantitative assessments based on the ratio of neurosteroid newly-synthesized per mg of proteins revealed a significant decrease of the amount of [<sup>3</sup>H]estradiol produced from [<sup>3</sup>H]PREG in neuroblastoma cells 12h, 24h and 48h after treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 3D). No difference was observed between the amounts of [<sup>3</sup>H]progesterone, [<sup>3</sup>H]T and [<sup>3</sup>H]3 $\alpha$ -androstenediol newly-synthesized from [<sup>3</sup>H]PREG in control and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stressed neuroblastoma cells (Fig. 3A-C).

Because we observed that, only [<sup>3</sup>H]estradiol synthesis was selectively inhibited by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> among all biochemical pathways converting [<sup>3</sup>H]PREG into various radioactive metabolites, we performed additional experiments to ensure whether H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> effectively controls the biological activity of aromatase, the key estradiol-synthesizing enzyme. Therefore, control and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stressed SH-SY5Y cells were incubated for 3h with [<sup>3</sup>H]T, a direct substrate used

by aromatase for [ $^3\text{H}$ ]estradiol synthesis. It appeared that  $\text{H}_2\text{O}_2$  is a potent inhibitor of the conversion of [ $^3\text{H}$ ]T into [ $^3\text{H}$ ]estradiol in neuroblastoma SH-SY5Y cells (Table 1).

#### **Effect of serum deprivation-evoked stress on neurosteroid biosynthesis in SH-SY5Y cells**

Pulse-chase and HPLC-Flo/One analyses revealed that control and serum deprivation-stressed SH-SY5Y cells were capable of converting [ $^3\text{H}$ ]PREG into various metabolites such as [ $^3\text{H}$ ]progesterone, [ $^3\text{H}$ ]17OHPROG, [ $^3\text{H}$ ]T and [ $^3\text{H}$ ]estradiol (Fig. 4). Quantitative measurement showed that, unlike the observation made under  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced stress condition, no biochemical reaction of neurosteroidogenic pathways (including estradiol synthesis) was modified in SH-SY5Y cells by serum deprivation-evoked stress (Fig. 4).

#### **Effects of $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced oxidative stress on aromatase gene expression in SH-SY5Y cells**

The levels of transcripts encoding aromatase in neuroblastoma cells were examined by real-time RT-PCR (rt-RT-PCR) in SH-SY5Y cells untreated or exposed to  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mM) for 12h, 24h and 48h. Figure 5A shows representative amplification curves for aromatase gene, GAPDH and the negative control. The continuous fluorescence monitoring of DNA copy numbers within an ample dynamic range provided a highly sensitive detection of specific template signals for aromatase and GAPDH in the neuroblastoma cells and testis, a classical steroidogenic tissue used as reference (Fig. 5A). Amplification reactions were followed by melting-curve analysis to ensure the specificity of rt-RT-PCR products (Fig. 5B).

After normalization of rt-RT-PCR aromatase product to GAPDH, it appeared that  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mM) induced a -95%, -91% or -99% decrease of aromatase mRNA level in SH-SY5Y cells after a 12h, 24h or 48h incubation period, respectively (Fig. 6A).

**Effect of letrozole on SH-SY5Y cell viability**

MTT reduction assays showed that chronic inhibition of aromatase activity in SH-SY5Y cells by the selective pharmacological agent letrozole led, after 4 days, to cell death. In particular, we observed that letrozole at 4, 6 or 8  $\mu\text{M}$  induced, respectively, 30%, 32% or 33% of SH-SY5Y cell death while concentrations from 0.1 to 3.5  $\mu\text{M}$  were ineffective (Fig. 6B).

**Effect of estradiol treatment on  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced SH-SY5Y cell death**

The observation of a down-regulation of aromatase gene expression and estradiol synthesis in oxidative stressed SH-SY5Y cells before death, led us to investigate the possible protective effect of estradiol against  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced cell loss. A 12h-pretreatment of SH-SY5Y cells followed by the maintenance of estradiol at 100 nM in the  $\text{H}_2\text{O}_2$ -associated culture medium completely prevented the cell death induced by  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mM) at 24h (Fig. 7A) and also at 48h (Fig. 7B) after the incubation onset. Estradiol at 10 nM was unable to protect SH-SY5Y cells against death. In the absence of  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced oxidative stress, estradiol did not increase the basal SH-SY5Y cell density neither at 10 nM nor at 100 nM.

**Effect of estradiol on letrozole-evoked cell death**

Incubation of SH-SY5Y cells for 4 days with letrozole (4, 6 or 8  $\mu\text{M}$ ) and estradiol (100 nM) markedly rescued neuroblastoma cells from letrozole-induced death. In particular, addition of estradiol at 100 nM prevented the death of 62%, 60% or 60% of the total number of SH-SY5Y cells killed, respectively, by letrozole at 4, 6 or 8  $\mu\text{M}$  in the absence of estradiol (Fig. 8).

## DISCUSSION

Oxidative stress is well-known as a pivotal process involved in many neurodegenerative diseases (Beal, 1995; Mizuno et al., 1998; Giasson et al., 2002; Andersen, 2004). The original aim of the present report was to check whether or not the process of endogenous neurosteroid synthesis belongs to cellular mechanisms selectively regulated in human neuroblastoma cells during H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress. Prior to investigation of the effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on neurosteroid biosynthesis in SH-SY5Y cells, we performed a series of cell viability assays in time and dose dependent manners in order to determine the optimal conditions for an effective H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress. These assays revealed that the effective concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inducing the death of a significant percentage of SH-SY5Y cells was 1 mM with an incubation time of 24h or 48h. Therefore, in all molecular, biochemical and pharmacological experiments performed in our study, we used H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 1 mM and for kinetic or time-course analyses we investigated various time points (3h, 6h, 12h, 24h and 48h) within a total period of 48h. The relatively high concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) required to obtain a significant percentage of cell death is due to the fact that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, well-known to be instable, decomposes rapidly *in vitro*. The stability index of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is ten to the minus 5 seconds (Giorgi et al., 2007). Thanks to a combination of various approaches, we observed that the inhibition of neurosteroidogenic pathway leading to endogenous estradiol formation in SH-SY5Y cells is a pivotal mechanism by which H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress causes human neuroblastoma cell death. Indeed, by using the well-validated method combining pulse-chase experiments, HPLC and Flo/One characterization (Mensah-Nyagan et al., 1994, 1996a,b; Patte-Mensah et al., 2003, 2005; Kibaly et al., 2005; Saredi et al., 2005; Schaeffer et al., 2006), we observed that [<sup>3</sup>H]estradiol was the only one neuroactive steroid the production of which from [<sup>3</sup>H]PREG dramatically decreased in SH-SY5Y cells under oxidative stress conditions. The conversion



of [ $^3\text{H}$ ]PREG into [ $^3\text{H}$ ]progesterone, [ $^3\text{H}$ ]T or [ $^3\text{H}$ ]3 $\alpha$ -androstenediol did not change in stressed SH-SY5Y cells. The biosynthesis of [ $^3\text{H}$ ]estradiol from the far precursor [ $^3\text{H}$ ]PREG requires the complementary activities of various enzymes such as 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (PREG conversion into progesterone), cytochrome P450c17 (progesterone conversion into androstenedione), 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (androstenedione transformation into testosterone) and aromatase, the key enzyme converting testosterone into estradiol (for review, Mensah-Nyagan et al., 1999). The fact that, along neurosteroidogenic pathways starting from the precursor [ $^3\text{H}$ ]PREG and leading to the far metabolite [ $^3\text{H}$ ]estradiol, only the biosynthesis of [ $^3\text{H}$ ]estradiol was significantly affected in stressed SH-SY5Y cells strongly suggests that aromatase activity may selectively be regulated by  $\text{H}_2\text{O}_2$ . To verify the existence of a real action of  $\text{H}_2\text{O}_2$  on aromatase activity, we investigated the conversion of [ $^3\text{H}$ ]T (a direct substrate used by aromatase) into [ $^3\text{H}$ ]estradiol by SH-SY5Y cells in the presence and absence of  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Our results clearly showed that  $\text{H}_2\text{O}_2$ , which reduced significantly [ $^3\text{H}$ ]T conversion into [ $^3\text{H}$ ]estradiol, is a potent inhibitor of aromatase activity in SH-SY5Y cells.

Our studies also revealed that, endogenous estradiol formation declined in  $\text{H}_2\text{O}_2$ -stressed SH-SY5Y cells 12h before the appearance of cell death. Therefore, we made the hypothesis that  $\text{H}_2\text{O}_2$  may induce cell death by down-regulating aromatase expression and/or activity in SH-SY5Y cells. To check this hypothesis, we have used the highly sensitive tool, rt-RT-PCR to investigate the time-course of  $\text{H}_2\text{O}_2$  effects on aromatase gene expression in neuroblastoma cells. Interestingly, we found that the gene encoding aromatase was down-regulated in  $\text{H}_2\text{O}_2$ -stressed SH-SY5Y cells 12h before the appearance of  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced cell death. This observation was perfectly in agreement with the decline of [ $^3\text{H}$ ]estradiol amount newly-synthesized from [ $^3\text{H}$ ]PREG 12h after the oxidative stress onset. At this incubation time (12h), no cell death was yet detected and significant loss of neuroblastoma cells appeared

from 24h to 48h, in other words, at least 12h after the down-regulation of both aromatase gene expression and enzymatic activity. Moreover, we observed that the chronic exposure of neuroblastoma cells to letrozole, the selective pharmacological inhibitor of aromatase activity (Lamb and Adkins, 1998; Buzdar, 2001), led after 4 days to the death of a significant percentage of cells. Interestingly, more than 60% of neuroblastoma SH-SY5Y cells were rescued from death when exogenous estradiol was added to the culture medium. Altogether, these results indicate that endogenous estradiol formation may contribute to the generation of a trophic and protective environment for neuroblastoma cells. Therefore,  $H_2O_2$  may induce SH-SY5Y cell death by unbalancing the protective intracellular and/or extracellular environment through the down-regulation of aromatase gene expression and endogenous estradiol production. This suggestion was strongly confirmed by the series of experiments that investigated the effect of estradiol treatment on  $H_2O_2$ -induced SH-SY5Y cell death. Indeed, we observed that a 12h-pretreatment of SH-SY5Y cells with estradiol at 100 nM completely prevented the cell death caused by  $H_2O_2$  at 1 mM. In the absence of  $H_2O_2$ -induced oxidative stress, estradiol did not increase the basal SH-SY5Y cell density. This observation indicates that estradiol, which does not exert a proliferative action on neuroblastoma cells, may protect them against death via a trophic or an anti-apoptotic mechanism. Indeed, it has been shown that estradiol counteract apoptotic effects induced by oxidative stress through the activation of the transcription of anti-apoptotic factors including Bcl-2 and Bcl-x<sub>L</sub> which contribute to the maintenance of mitochondrial membrane integrity (Singer et al., 1998; Pike, 1999). Estradiol is also capable of preventing ATP production decline evoked by  $H_2O_2$  (Wang et al., 2006). Moreover, our results in human neuroblastoma  $H_2O_2$ -stressed cells are in agreement with the data obtained in rodent brain tissues suggesting a potential neuroprotective action of aromatase and endogenous estradiol against kainic acid cytotoxicity (Garcia-Segura et al., 1999, 2001, 2003; Azcoitia et al., 2001; Veiga et al., 2005). A recent work has also

demonstrated that aromatase inhibition in hippocampal dispersed cells decreased proliferation and enhanced apoptosis of granule cells (Fester et al., 2006). Our investigations also showed that serum deprivation-evoked stress (Macleod et al. 2001; Fitzgerald et al. 2007), which has also killed a significant number of SH-SY5Y cells, did not modify neurosteroid biosynthetic pathways, suggesting that the induction of cell death through inhibition of neuroprotective-neurosteroid estradiol production may be specific for  $H_2O_2$ -induced stress.

Moreover, several lines of evidence have shown that estradiol exhibits anti-oxidant and neuroprotective effects which are independent from estrogen receptor expression and activity (Moosmann and Behl, 1999; Behl and Manthey, 2000; Behl and Moosmann, 2002). In particular, it has been demonstrated that estradiol carries a lipophilic structure and a phenolic group which enables the molecule to detoxify highly reactive hydroxyl radicals (for review, Manthey and Behl, 2006). Therefore, it is possible to suggest a complementary view for the interpretation of our results. Indeed, in the normal culture medium or in the presence of  $H_2O_2$  amounts less than 1 mM, the level of endogenous estradiol produced in SH-SY5Y cells may be sufficient to detoxify all ROS and that may be why we observed no cell death in these conditions. In contrast, when exogenous applications of  $H_2O_2$  reached 1 mM, the cell death detected may result from the direct cytotoxicity induced by the rest of  $H_2O_2$  which escaped from detoxification by endogenous estradiol the level of which was not enough high to react chemically with all ROS. In support of this suggestion, addition of estradiol (100 nM) to the incubation medium was sufficient to rescue completely neuroblastoma cells from death evoked by  $H_2O_2$  at 1 mM. Since aromatase gene was down-regulated in SH-SY5Y cells exposed to  $H_2O_2$  (1 mM) and because chronic application of letrozole induced a cell death prevented by estradiol, it appears that  $H_2O_2$  may aggravate its intrinsic or own toxic action by decreasing endogenous estradiol concentration via the repression of aromatase gene and bioactivity in neuroblastoma cells.

In conclusion, our results provide three novel findings that may constitute significant advances in the research area on neurosteroids, particularly in the identification of key neuropathologic factors interacting with the process of neurosteroidogenesis. The data demonstrate that:

- (i) the process of neurosteroidogenesis is selectively and significantly regulated in human neuroblastoma cells by  $H_2O_2$  which is a key factor involved in the etiology of various neural disorders
- (ii)  $H_2O_2$  down-regulates neurosteroid estradiol biosynthesis in SH-SY5Y cells through aromatase gene repression
- (iii) the neurosteroid estradiol endogenously synthesized in SH-SY5Y cells strongly determines their viability and survival.

Because the process leading to cell death through the down-regulation of neuroprotective-neurosteroid estradiol synthesis seems to be specific for  $H_2O_2$ -induced oxidative stress, selective targeting of neurosteroidogenic pathways may constitute an interesting strategy to develop against  $H_2O_2$ -evoked neurodegenerative mechanisms.

## Acknowledgements

This work was supported by grants from Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, France) and Université Louis Pasteur (Strasbourg, France). VS was the recipient of a fellowship from the Neuroscience Upper Rhine Network Neurex. Special thanks to Dr Pascale Piguet (Scientific Coordinator of Neurex, Basel) and Mrs. Stéphanie Klipfel (Administrative Director of Neurex, Strasbourg).

## REFERENCES

- Andersen JK (2004) Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med* 10 Suppl:S18-25.
- Azcoitia I, Sierra A, Veiga S, Honda S, Harada N, Garcia-Segura LM (2001) Brain aromatase is neuroprotective. *J Neurobiol* 47:318-329.
- Baulieu EE, Robel P, Schumacher M (1999) *Contemporary Endocrinology* (Baulieu EE, Robel P, Schumacher M, eds), pp 1-377 Totowa, NJ: Humana Press.
- Beal MF (1995) Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann Neurol* 38:357-366.
- Behl C, Davis JB, Lesley R, Schubert D (1994) Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* 77:817-827.
- Behl C, Manthey D (2000) Neuroprotective activities of estrogen: an update. *J Neurocytol* 29:351-359.
- Behl C, Moosmann B (2002) Antioxidant neuroprotection in Alzheimer's disease as preventive and therapeutic approach. *Free Radic Biol Med* 33:182-191.
- Bellomo G, Santambrogio L, Fiacconi M, Scarponi AM, Ciuffetti G (1991) Plasma profiles of adrenocorticotrophic hormone, cortisol, growth hormone and prolactin in patients with untreated Parkinson's disease. *J Neurol* 238:19-22.
- Butterfield DA, Castegna A, Lauderback CM, Drake J (2002) Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. *Neurobiol Aging* 23:655-664.
- Buzdar AU (2001) A summary of second-line randomized studies of aromatase inhibitors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 79:109-114.

- Carlson LE, Sherwin BB, Chertkow HM (1999) Relationships between dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) and cortisol (CRT) plasma levels and everyday memory in Alzheimer's disease patients compared to healthy controls. *Horm Behav* 35:254-263.
- Charlett A, Dobbs RJ, Purkiss AG, Wright DJ, Peterson DW, Weller C, Dobbs SM (1998) Cortisol is higher in parkinsonism and associated with gait deficit. *Acta Neurol Scand* 97:77-85.
- Davis BM, Mohs RC, Greenwald BS, Mathe AA, Johns CA, Horvath TB, Davis KL (1985) Clinical studies of the cholinergic deficit in Alzheimer's disease. I. Neurochemical and neuroendocrine studies. *J Am Geriatr Soc* 33:741-748.
- Dexter DT, Carter CJ, Wells FR, Javoy-Agid F, Agid Y, Lees A, Jenner P, Marsden CD (1989) Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *J Neurochem* 52:381-389.
- di Michele F, Caltagirone C, Bonaviri G, Romeo E, Spalletta G (2005) Plasma dehydroepiandrosterone levels are strongly increased in schizophrenia. *J Psychiatr Res* 39:267-273.
- Fester L, Ribeiro-Gouveia V, Prange-Kiel J, von Schassen C, Bottner M, Jarry H, Rune GM (2006) Proliferation and apoptosis of hippocampal granule cells require local oestrogen synthesis. *J Neurochem* 97:1136-1144.
- Fitzgerald JC, Ufer C, Billett EE (2007) A link between monoamine oxidase-A and apoptosis in serum deprived human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Neural Transm* 114:807-810.
- Gallagher P, Watson S, Smith MS, Young AH, Ferrier IN (2007) Plasma cortisol-dehydroepiandrosterone (DHEA) ratios in schizophrenia and bipolar disorder. *Schizophr Res* 90:258-265.

- Garcia-Segura LM, Wozniak A, Azcoitia I, Rodriguez JR, Hutchison RE, Hutchison JB (1999) Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair. *Neuroscience* 89:567-578.
- Garcia-Segura LM, Azcoitia I, DonCarlos LL (2001) Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol* 63:29-60.
- Garcia-Segura LM, Veiga S, Sierra A, Melcangi RC, Azcoitia I (2003) Aromatase: a neuroprotective enzyme. *Prog Neurobiol* 71:31-41.
- Giasson BI, Ischiropoulos H, Lee VM, Trojanowski JQ (2002) The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Free Radic Biol Med* 32:1264-1275.
- Giorgi M, Trinei M, Migliaccio E, Pelicci PG (2007) Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:722-728.
- Good PF, Hsu A, Werner P, Perl DP, Olanow CW (1998) Protein nitration in Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:338-342.
- Guarneri P, Cascio C, Piccoli T, Piccoli F, Guarneri R (2000) Human neuroblastoma SH-SY5Y cell line: neurosteroid-producing cell line relying on cytoskeletal organization. *J Neurosci Res* 60:656-665.
- Harris DS, Wolkowitz OM, Reus VI (2001) Movement disorder, memory, psychiatric symptoms and serum DHEA levels in schizophrenic and schizoaffective patients. *World J Biol Psychiatry* 2:99-102.
- Hensley K, Maidt ML, Yu Z, Sang H, Markesbery WR, Floyd RA (1998) Electrochemical analysis of protein nitrotyrosine and dityrosine in the Alzheimer brain indicates region-specific accumulation. *J Neurosci* 18:8126-8132.

- Ishunina TA, van Beurden D, van der Meulen G, Unmehopa UA, Hol EM, Huitinga I, Swaab DF (2005) Diminished aromatase immunoreactivity in the hypothalamus, but not in the basal forebrain nuclei in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 26:173-194.
- Jämsä A, Hasslund K, Cowburn RF, Bäckström A, Vasänge M (2004) The retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor differentiated SH-SY5Y cell line as a model for Alzheimer's disease-like tau phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 319: 993-1000.
- Khan MM, Evans DR, Gunna V, Scheffer RE, Parikh VV, Mahadik SP (2002) Reduced erythrocyte membrane essential fatty acids and increased lipid peroxides in schizophrenia at the never-medicated first-episode of psychosis and after years of treatment with antipsychotics. *Schizophr Res* 58:1-10.
- Kibaly C, Patte-Mensah C, Mensah-Nyagan AG (2005) Molecular and neurochemical evidence for the biosynthesis of dehydroepiandrosterone in the adult rat spinal cord. *J Neurochem* 93:1220-1230.
- Kim SB, Hill M, Kwak YT, Hampl R, Jo DH, Morfin R (2003) Neurosteroids: Cerebrospinal fluid levels for Alzheimer's disease and vascular dementia diagnostics. *J Clin Endocrinol Metab* 88:5199-5206.
- Lamb HM, Adkins JC (1998) Letrozole. A review of its use in postmenopausal women with advanced breast cancer. *Drugs* 56:1125-1140.
- Leblhuber F, Neubauer C, Peichl M, Reisecker F, Steinparz FX, Windhager E, Dienstl E (1993) Age and sex differences of dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) and cortisol (CRT) plasma levels in normal controls and Alzheimer's disease (AD). *Psychopharmacology (Berl)* 111:23-26.



- Legrain S, Berr C, Frenoy N, Gourlet V, Debuire B, Baulieu EE (1995) Dehydroepiandrosterone sulfate in a long-term care aged population. *Gerontology* 41:343-351.
- Li YP, Bushnell AF, Lee CM, Perlmutter LS, Wong SK (1996) Beta-amyloid induces apoptosis in human-derived neurotypic SH-SY5Y cells. *Brain Res* 738:196-204.
- Lohr JB, Kuczenski R, Bracha HS, Moir M, Jeste DV (1990) Increased indices of free radical activity in the cerebrospinal fluid of patients with tardive dyskinesia. *Biol Psychiatry* 28:535-539.
- Macleod AR, Allsopp TE, McLuckie J, Kelly JS (2001) Serum withdrawal causes apoptosis in SH-SY5Y cells. *Brain Res* 889:308-315.
- Mahadik SP, Mukherjee S (1996) Free radical pathology and antioxidant defense in schizophrenia: a review. *Schizophr Res* 19:1-17.
- Manthey D, Behl C (2006) From structural biochemistry to expression profiling: neuroprotective activities of estrogen. *Neuroscience* 138:845-850.
- Melcangi RC, Maggi R, Martini L (1993) Testosterone and progesterone metabolism in the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *J Steroid Biochem Mol Biol* 46:811-818.
- Mensah-Nyagan AG, Feuilloley M, Dupont E, Do-Rego JL, Leboulenger F, Pelletier G, Vaudry H (1994) Immunocytochemical localization and biological activity of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the central nervous system of the frog. *J Neurosci* 14:7306-7318.
- Mensah-Nyagan AG, Do-Rego JL, Feuilloley M, Marcual A, Lange C, Pelletier G, Vaudry H (1996a) In vivo and in vitro evidence for the biosynthesis of testosterone in the telencephalon of the female frog. *J Neurochem* 67:413-422.
- Mensah-Nyagan AG, Feuilloley M, Do-Rego JL, Marcual A, Lange C, Tonon MC, Pelletier G, Vaudry H (1996b) Localization of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase and

- characterization of testosterone in the brain of the male frog. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:1423-1428.
- Mensah-Nyagan AG, Do-Rego JL, Beaujean D, Luu-The V, Pelletier G, Vaudry H (1999) Neurosteroids: expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the central nervous system. *Pharmacol Rev* 51:63-81.
- Miranda S, Opazo C, Larrondo LF, Munoz FJ, Ruiz F, Leighton F, Inestrosa NC (2000) The role of oxidative stress in the toxicity induced by amyloid beta-peptide in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 62:633-648.
- Misonou H, Morishima-Kawashima M, Ihara Y (2000) Oxidative stress induces intracellular accumulation of amyloid beta-protein (A $\beta$ ) in human neuroblastoma cells. *Biochemistry* 39:6951-6959.
- Mizuno Y, Yoshino H, Ikebe S, Hattori N, Kobayashi T, Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kondo T (1998) Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 44:S99-109.
- Moosmann B, Behl C (1999) The antioxidant neuroprotective effects of estrogens and phenolic compounds are independent from their estrogenic properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:8867-8872.
- Murialdo G, Nobili F, Rollero A, Gianelli MV, Copello F, Rodriguez G, Polleri A (2000) Hippocampal perfusion and pituitary-adrenal axis in Alzheimer's disease. *Neuropsychobiology* 42:51-57.
- Näsman B, Olsson T, Seckl JR, Eriksson S, Viitanen M, Bucht G, Carlström K (1995) Abnormalities in adrenal androgens, but not of glucocorticoids, in early Alzheimer's disease. *Psychoneuroendocrinology* 20:83-94.
- Olivieri G, Novakovic M, Savaskan E, Meier F, Baysang G, Brockhaus M, Muller-Spahn F (2002) The effects of beta-estradiol on SHSY5Y neuroblastoma cells during heavy metal

- induced oxidative stress, neurotoxicity and beta-amyloid secretion. *Neuroscience* 113:849-855.
- Patte-Mensah C, Kappes V, Freund-Mercier MJ, Tsutsui K, Mensah-Nyagan AG (2003) Cellular distribution and bioactivity of the key steroidogenic enzyme, cytochrome P450side chain cleavage, in sensory neural pathways. *J Neurochem* 86:1233-1246.
- Patte-Mensah C, Li S, Mensah-Nyagan AG (2004) Impact of neuropathic pain on the gene expression and activity of cytochrome P450side-chain-cleavage in sensory neural networks. *Cell Mol Life Sci* 61:2274-2284.
- Patte-Mensah C, Kibaly C, Mensah-Nyagan AG (2005) Substance P inhibits progesterone conversion to neuroactive metabolites in spinal sensory circuit: a potential component of nociception. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:9044-9049.
- Patte-Mensah C, Kibaly C, Boudard D, Schaeffer V, Begle A, Saredi S, Meyer L, Mensah-Nyagan AG (2006) Neurogenic pain and steroid synthesis in the spinal cord. *J Mol Neurosci* 28:17-31.
- Pike CJ (1999) Estrogen modulates neuronal Bcl-xL expression and beta-amyloid-induced apoptosis: relevance to Alzheimer's disease. *J Neurochem* 72:1552-1563.
- Rasmuson S, Näsman B, Carlström K, Olsson T (2002) Increased levels of adrenocortical and gonadal hormones in mild to moderate Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 13:74-79.
- Reddy RD, Yao JK (1996) Free radical pathology in schizophrenia: a review. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 55:33-43.
- Ritsner M, Maayan R, Gibel A, Strous RD, Modai I, Weizman A (2004) Elevation of the cortisol/dehydroepiandrosterone ratio in schizophrenia patients. *Eur Neuropsychopharmacol* 14:267-273.

- Ritsner M, Gibel A, Ram E, Maayan R, Weizman A (2006) Alterations in DHEA metabolism in schizophrenia: two-month case-control study. *Eur Neuropsychopharmacol* 16:137-146.
- Saredi S, Patte-Mensah C, Melcangi RC, Mensah-Nyagan AG (2005) Effect of streptozotocin-induced diabetes on the gene expression and biological activity of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat spinal cord. *Neuroscience* 135:869-877.
- Schaeffer V, Patte-Mensah C, Eckert A, Mensah-Nyagan AG (2006) Modulation of neurosteroid production in human neuroblastoma cells by Alzheimer's disease key proteins. *J Neurobiol* 66:868-881.
- Schubert D, Behl C, Lesley R, Brack A, Dargusch R, Sagara Y, Kimura H (1995) Amyloid peptides are toxic via a common oxidative mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:1989-1993.
- Shirayama Y, Hashimoto K, Suzuki Y, Higuchi T (2002) Correlation of plasma neurosteroid levels to the severity of negative symptoms in male patients with schizophrenia. *Schizophr Res* 58:69-74.
- Singer CA, Rogers KL, Dorsa DM (1998) Modulation of Bcl-2 expression: a potential component of estrogen protection in NT2 neurons. *Neuroreport* 9:2565-2568.
- Smith MA, Richey Harris PL, Sayre LM, Beckman JS, Perry G (1997) Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 17:2653-2657.
- Soto-Otero R, Mendez-Alvarez E, Hermida-Ameijeiras A, Munoz-Patino AM, Labandeira-Garcia JL (2000) Autoxidation and neurotoxicity of 6-hydroxydopamine in the presence of some antioxidants: potential implication in relation to the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurochem* 74:1605-1612.
- Sunderland T, Merril CR, Harrington MG, Lawlor BA, Molchan SE, Martinez R, Murphy DL (1989) Reduced plasma dehydroepiandrosterone concentrations in Alzheimer's disease. *Lancet* 2:570.

- Tabner BJ, El-Agnaf OM, Turnbull S, German MJ, Paleologou KE, Hayashi Y, Cooper LJ, Fullwood NJ, Allsop D (2005) Hydrogen peroxide is generated during the very early stages of aggregation of the amyloid peptides implicated in Alzheimer disease and familial British dementia. *J Biol Chem* 280:35789-35792.
- Tamagno E, Robino G, Obbili A, Bardini P, Aragno M, Parola M, Danni O (2003) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 4-hydroxynonenal mediate amyloid beta-induced neuronal apoptosis by activating JNKs and p38MAPK. *Exp Neurol* 180:144-155.
- Turnbull S, Tabner BJ, El-Agnaf OM, Moore S, Davies Y, Allsop D (2001) alpha-Synuclein implicated in Parkinson's disease catalyses the formation of hydrogen peroxide in vitro. *Free Radic Biol Med* 30:1163-1170.
- Turnbull S, Tabner BJ, Brown DR, Allsop D (2003) Generation of hydrogen peroxide from mutant forms of the prion protein fragment PrP121-231. *Biochemistry* 42:7675-7681.
- Veiga S, Azcoitia I, Garcia-Segura LM (2005) Extragonadal synthesis of estradiol is protective against kainic acid excitotoxic damage to the hippocampus. *Neuroreport* 16:1599-1603.
- Wang X, Dykens JA, Perez E, Liu R, Yang S, Covey DF, Simpkins JW (2006) Neuroprotective effects of 17beta-estradiol and nonfeminizing estrogens against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> toxicity in human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Mol Pharmacol* 70:395-404.
- Weill-Engerer S, David JP, Sazdovitch V, Liere P, Eychenne B, Pianos A, Schumacher M, Delacourte A, Baulieu EE, Akwa Y (2002) Neurosteroid quantification in human brain regions: comparison between Alzheimer's and nondemented patients. *J Clin Endocrinol Metab* 87:5138-5143.
- Weiner MF, Vobach S, Svetlik D, Risser RC (1993) Cortisol secretion and Alzheimer's disease progression: a preliminary report. *Biol Psychiatry* 34:158-161.

- Wozniak A, Hutchison RE, Morris CM, Hutchison JB (1998) Neuroblastoma and Alzheimer's disease brain cells contain aromatase activity. *Steroids* 63:263-267.
- Yatin SM, Varadarajan S, Link CD, Butterfield DA (1999) In vitro and in vivo oxidative stress associated with Alzheimer's amyloid beta-peptide (1-42). *Neurobiol Aging* 20:325-330; discussion 339-342.
- Yoritaka A, Hattori N, Uchida K, Tanaka M, Stadtman ER, Mizuno Y (1996) Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2696-2701.

**Table 1.** Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the amount of [<sup>3</sup>H]estradiol produced from [<sup>3</sup>H]testosterone.

		Amount of [ <sup>3</sup> H]estradiol synthesized from [ <sup>3</sup> H]testosterone (% of control)
Untreated cells (control)		100 ± 12 %
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> treated cells	3h	80 ± 14 % <sup>NS, NS6, NS12, NS24, NS48</sup>
	6h	75 ± 6 % <sup>NS, NS3, NS12, NS24, NS48</sup>
	12h	30 ± 4 % <sup>**, NS3, NS6, NS24, NS48</sup>
	24h	45 ± 8 % <sup>*, NS3, NS6, NS12, NS48</sup>
	48h	53 ± 9 % <sup>*, NS3, NS6, NS12, NS24</sup>

Each value was calculated as the relative amount of [<sup>3</sup>H]estradiol compared with the total [<sup>3</sup>H]-labeled compounds resolved by HPLC-Flo/One characterization (x100) and was normalized with the protein concentration. The values were then expressed as percentages of the amount of [<sup>3</sup>H]estradiol produced in the control SH-SY5Y cells. Each value is the mean ± SEM of four independent experiments. \* p < 0.05; \*\* p < 0.01 vs control. Not statistically different from control (NS), from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells during 3h (NS3), 6h (NS6), 12h (NS12), 24h (NS24) or 48h (NS48).

## FIGURE LEGENDS

**Fig. 1.** (A) Dose-response and time-course studies of the effect of oxidative stress on SH-SY5Y cell viability after 3h, 6h, 12h, 24h or 48h treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (B) Effect of serum deprivation-evoked stress on SH-SY5Y cell viability 48h after the deprivation onset. MTT assays were used to determine the cell viability which was expressed as percent of control (unstressed) cells. Each value is the mean  $\pm$  SEM of four independent experiments. \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

**Fig. 2.** Characterization of [<sup>3</sup>H]-neurosteroids produced, after a 3h incubation with [<sup>3</sup>H]PREG, by control SH-SY5Y cells (A) and stressed cells 3h (B), 6h (C), 12h (D), 24h (E) and 48h (F) after treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM). Analyses were performed using a hexane/isopropanol gradient and a reverse-HPLC system coupled to a flow scintillation detector. The ordinate indicates the radioactivity measured in the HPLC eluent. The dashed line represents the gradient of secondary solvent (% isopropanol). The arrows indicate elution positions of standard steroids. PROG, progesterone; PREG, pregnenolone; T, testosterone; 3 $\alpha$ DIOL, 3 $\alpha$ -androstanediol.

**Fig. 3.** Quantitative analysis of the action of oxidative stress on [<sup>3</sup>H]PREG conversion into [<sup>3</sup>H]progesterone (A), [<sup>3</sup>H]testosterone (B), [<sup>3</sup>H]3 $\alpha$ -androstanediol (C) and [<sup>3</sup>H]estradiol (D) in SH-SY5Y cells. Time-course investigations showed that estradiol is the main neurosteroid the synthesis of which is significantly decreased in SH-SY5Y cells 12h, 24h and 48h after the onset of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress. The values were obtained from experiments similar to that presented in Figure 2. Each value was calculated as the relative amount of [<sup>3</sup>H]-neurosteroid compared with the total [<sup>3</sup>H]-labeled compounds resolved by HPLC-Flo/One



characterization (x100) and was normalized with the protein concentration. The values were then expressed as percentages of the amount of each steroid formed in the control SH-SY5Y cells. Each value is the mean  $\pm$  SEM of four independent experiments. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ . NS, not statistically different.

**Fig. 4.** Quantitative analysis of the effect of serum deprivation-evoked stress on [ $^3$ H]PREG conversion into [ $^3$ H]progesterone (A), [ $^3$ H]17OHPROG (B), [ $^3$ H]testosterone (C) and [ $^3$ H]estradiol (D) in SH-SY5Y cells. The values were obtained from experiments similar to that presented in Figure 2. Each value was calculated as the relative amount of [ $^3$ H]-neurosteroid compared with the total [ $^3$ H]-labeled compounds resolved by HPLC-Flo/One characterization (x100) and was normalized with the protein concentration. The values were then expressed as percentages of the amount of each steroid formed in the control SH-SY5Y cells. Each value is the mean  $\pm$  SEM of four independent experiments. No difference was observed between the amounts of [ $^3$ H]neurosteroids newly-synthesized from [ $^3$ H]PREG in serum deprivation stressed SH-SY5Y cells compared to controls. NS, not statistically different.

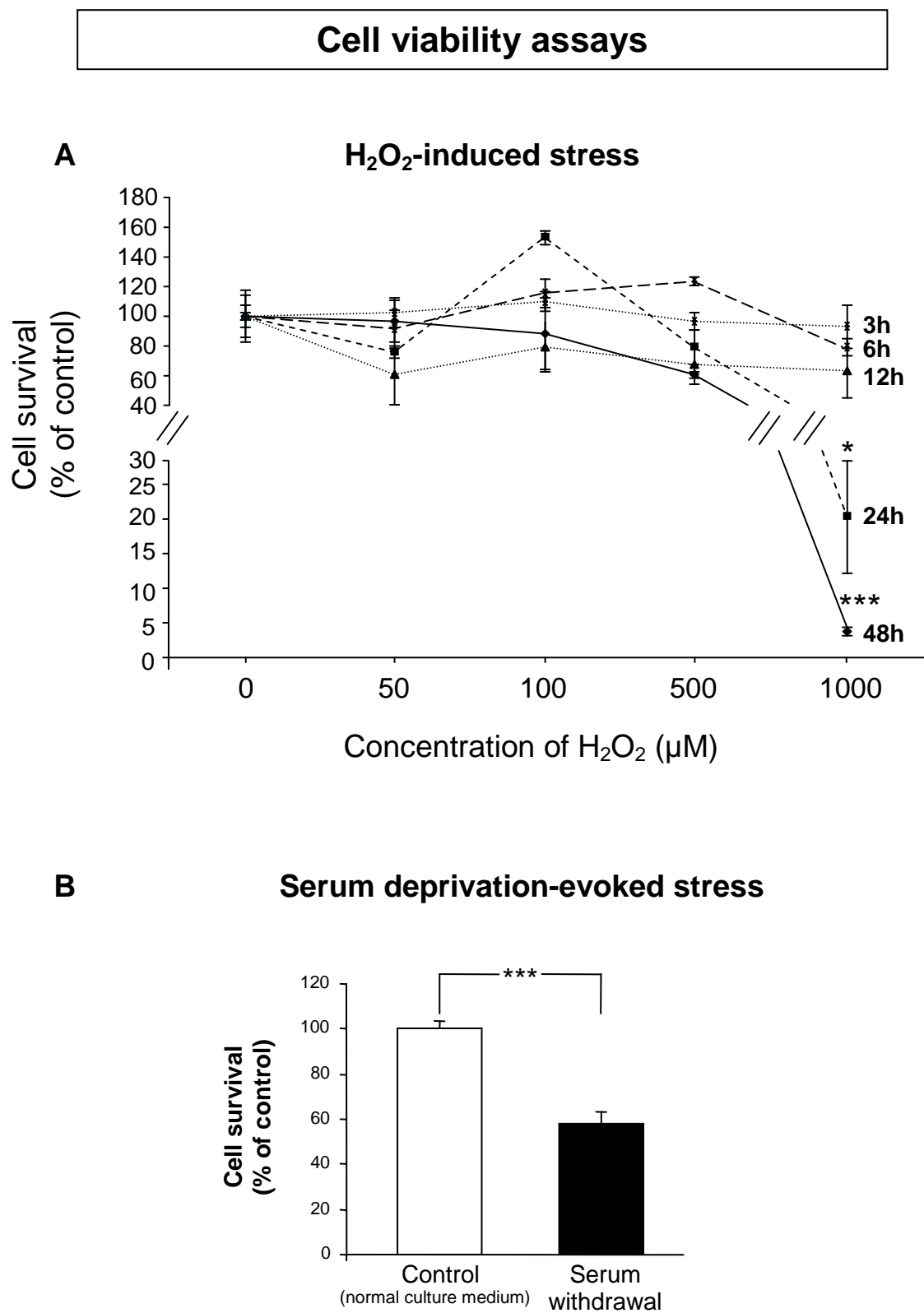
**Fig. 5.** Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress on aromatase gene expression in SH-SY5Y cells. (A) rt-RT-PCR amplification of aromatase and GAPDH genes. rt-RT-PCR obtained in the testis and in SH-SY5Y neuroblastoma cells untreated (NT) or subjected to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment for 12h, 24h or 48h. (B) Melting-curve analysis of aromatase and GAPDH rt-RT-PCR products showing the very high degree of specificity of amplified dsDNA.

**Fig. 6.** (A) Aromatase mRNA level is expressed as a ratio of GAPDH mRNA amount in control or untreated neuroblastoma cells (NT) and in SH-SY5Y cells exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for

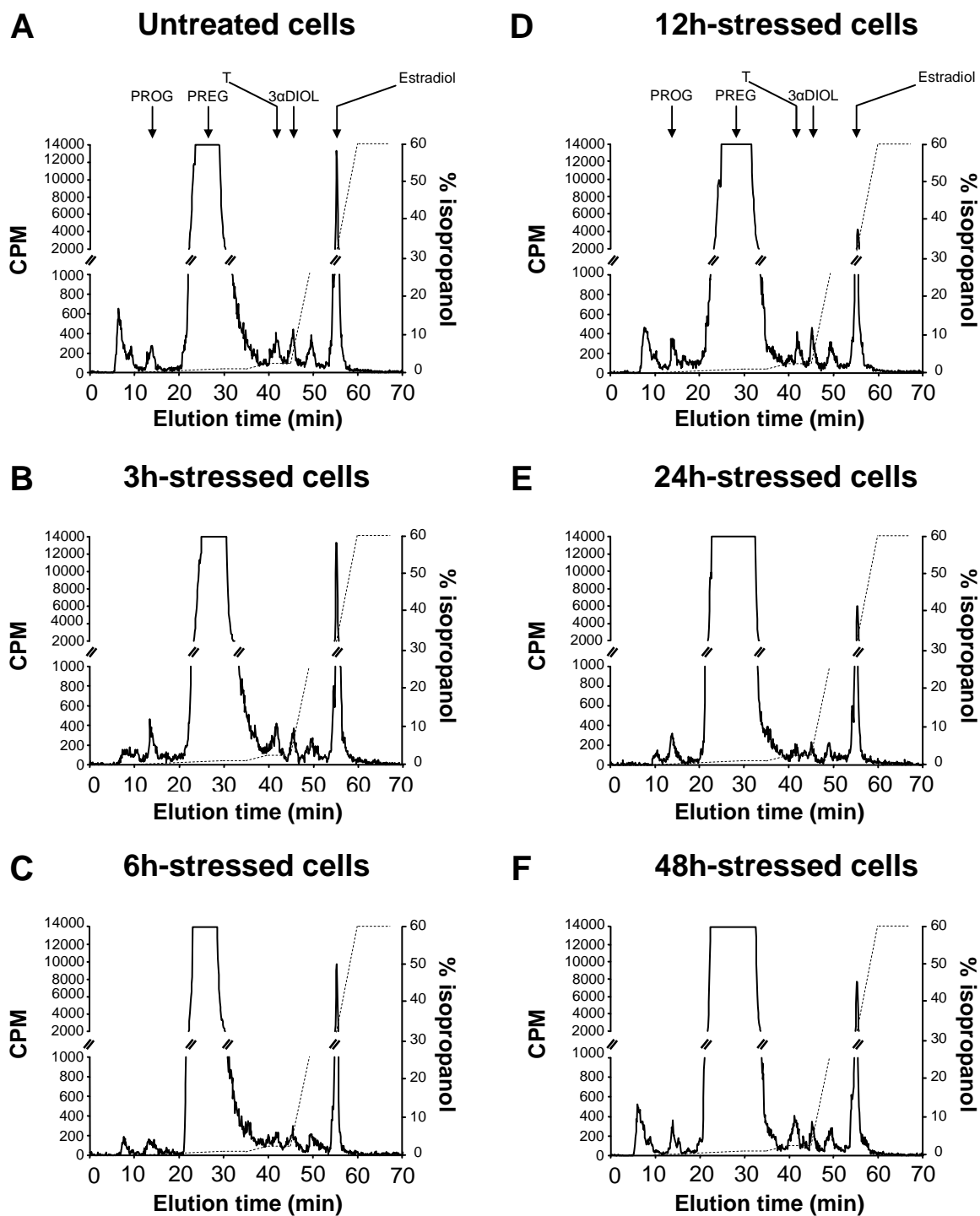
12h, 24h or 48h. Each value is the mean  $\pm$  SEM of four independent experiments. \*  $p < 0.05$ . NS, not statistically different. (B) Dose-response study of the effect of letrozole on SH-SY5Y cell viability after 4 days of treatment. MTT reduction assays were used to determine the cell viability which was expressed as percent of control (untreated) cells. Each value is the mean  $\pm$  SEM of four independent experiments. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  vs 4  $\mu$ M letrozole. ##  $p < 0.01$ ; ###  $p < 0.001$  vs 6  $\mu$ M letrozole. §§  $p < 0.01$ ; §§§  $p < 0.001$  vs 8  $\mu$ M letrozole.

**Fig. 7.** Neuroprotective effects of estradiol against  $H_2O_2$ -induced oxidative stress. SH-SY5Y cells were pretreated with the normal culture medium alone or the normal medium containing estradiol at 10 or 100 nM. After the pretreatment, each one of these categories of SH-SY5Y cells was incubated for 24h (A) or 48h (B) with the normal culture medium (NT<sub>24</sub> and NT<sub>48</sub>), the normal medium containing estradiol alone at 10 nM (groups [E<sub>2</sub>10]<sub>24</sub> and [E<sub>2</sub>10]<sub>48</sub>) or 100 nM (groups [E<sub>2</sub>100]<sub>24</sub> and [E<sub>2</sub>100]<sub>48</sub>), the normal medium with only  $H_2O_2$  at 1 mM (groups [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sub>24</sub> and [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sub>48</sub>) or the normal medium containing both  $H_2O_2$  (1 mM) and estradiol at 10 nM (groups [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+E<sub>2</sub>10]<sub>24</sub> and [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+E<sub>2</sub>10]<sub>48</sub>) or 100 nM (groups [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+E<sub>2</sub>100]<sub>24</sub> and [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+E<sub>2</sub>100]<sub>48</sub>). Each value is the mean  $\pm$  SEM of four independent experiments. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

**Fig. 8.** Neuroprotective effects of estradiol against letrozole-induced cell death. SH-SY5Y cells were incubated with the normal culture medium alone (control) or the normal culture medium containing letrozole (Let) at 4, 6 or 8  $\mu$ M in the presence (+) or absence (-) of estradiol at 100 nM. MTT reduction assays were used to determine the cell viability. Each value is the mean  $\pm$  SEM of four independent experiments. \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

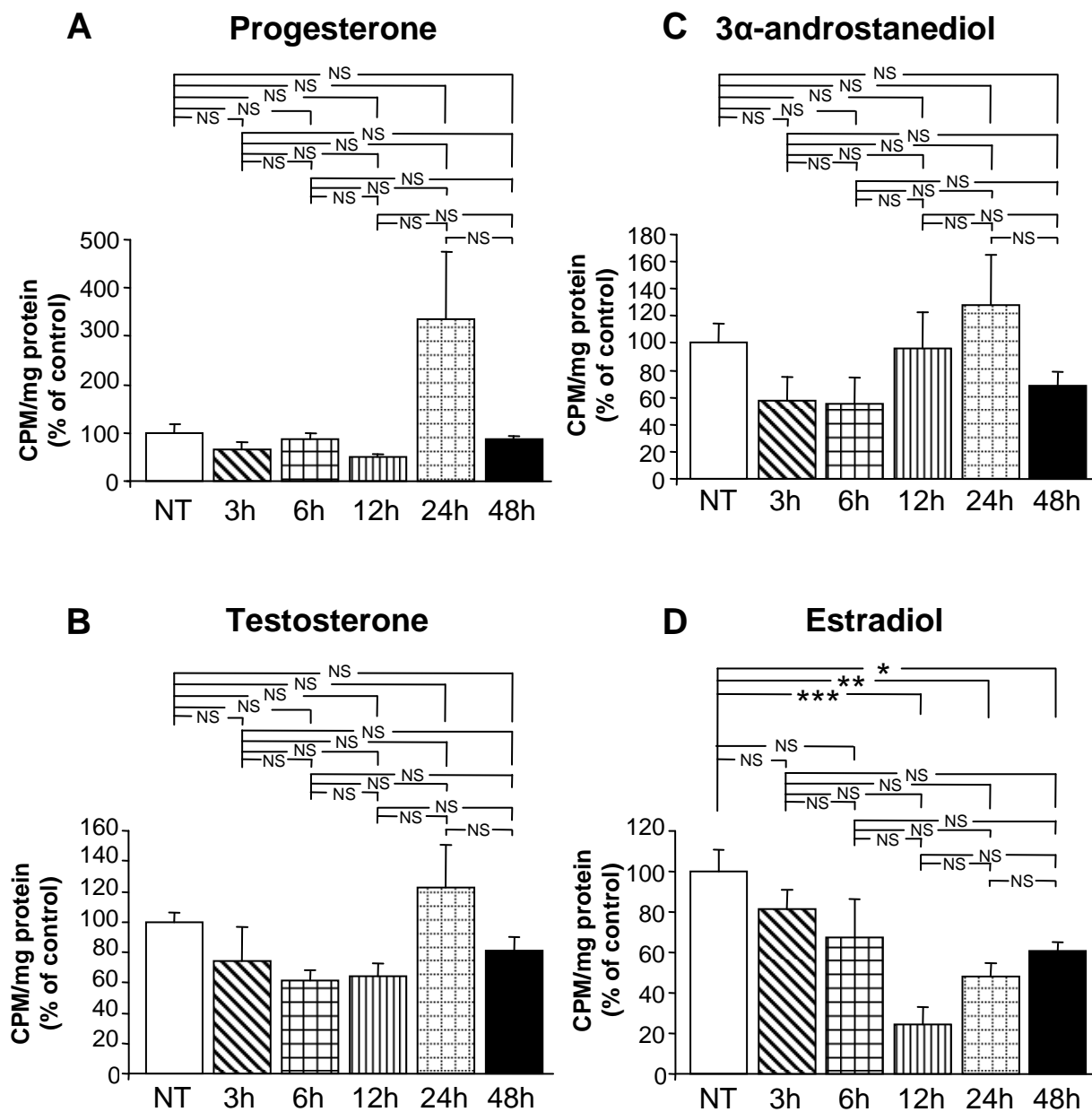
**Figure 1**

# Qualitative Pulse-chase-HPLC-Flo/One



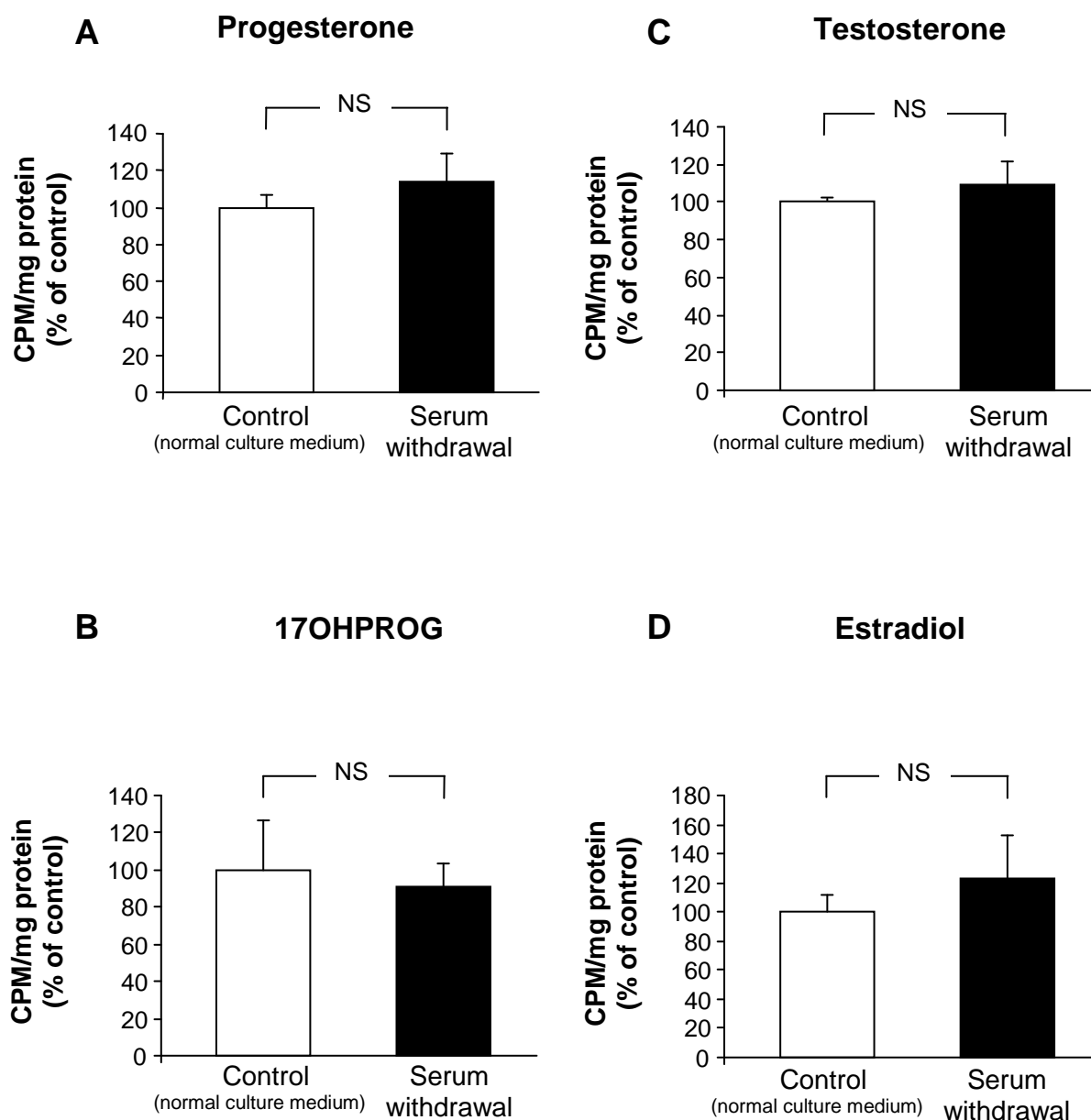
**Figure 2**

## Quantitative assessment of [ $^3\text{H}$ ]-neurosteroids produced under $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced stress condition

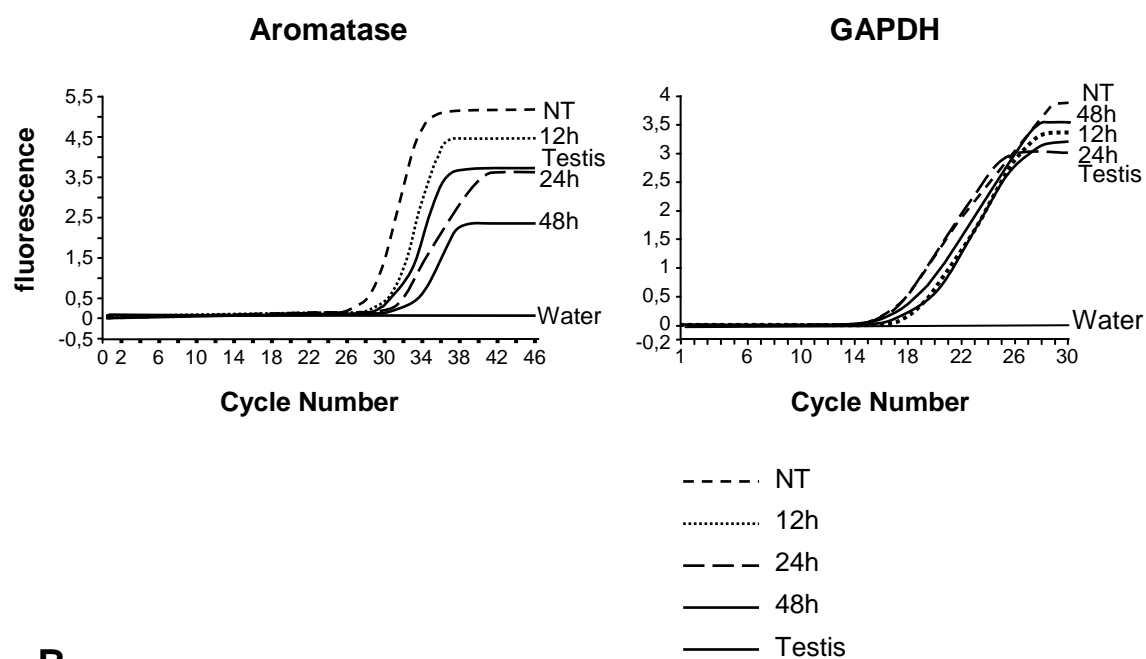
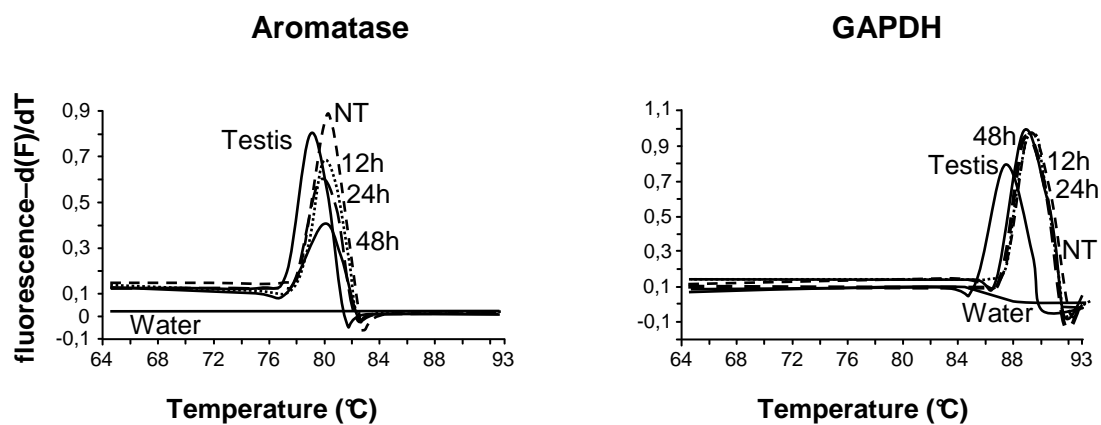


**Figure 3**

**Quantitative assessment of [ $^3\text{H}$ ]-neurosteroids synthesized under serum deprivation-evoked stress**



**Figure 4**

**A****B****Figure 5**

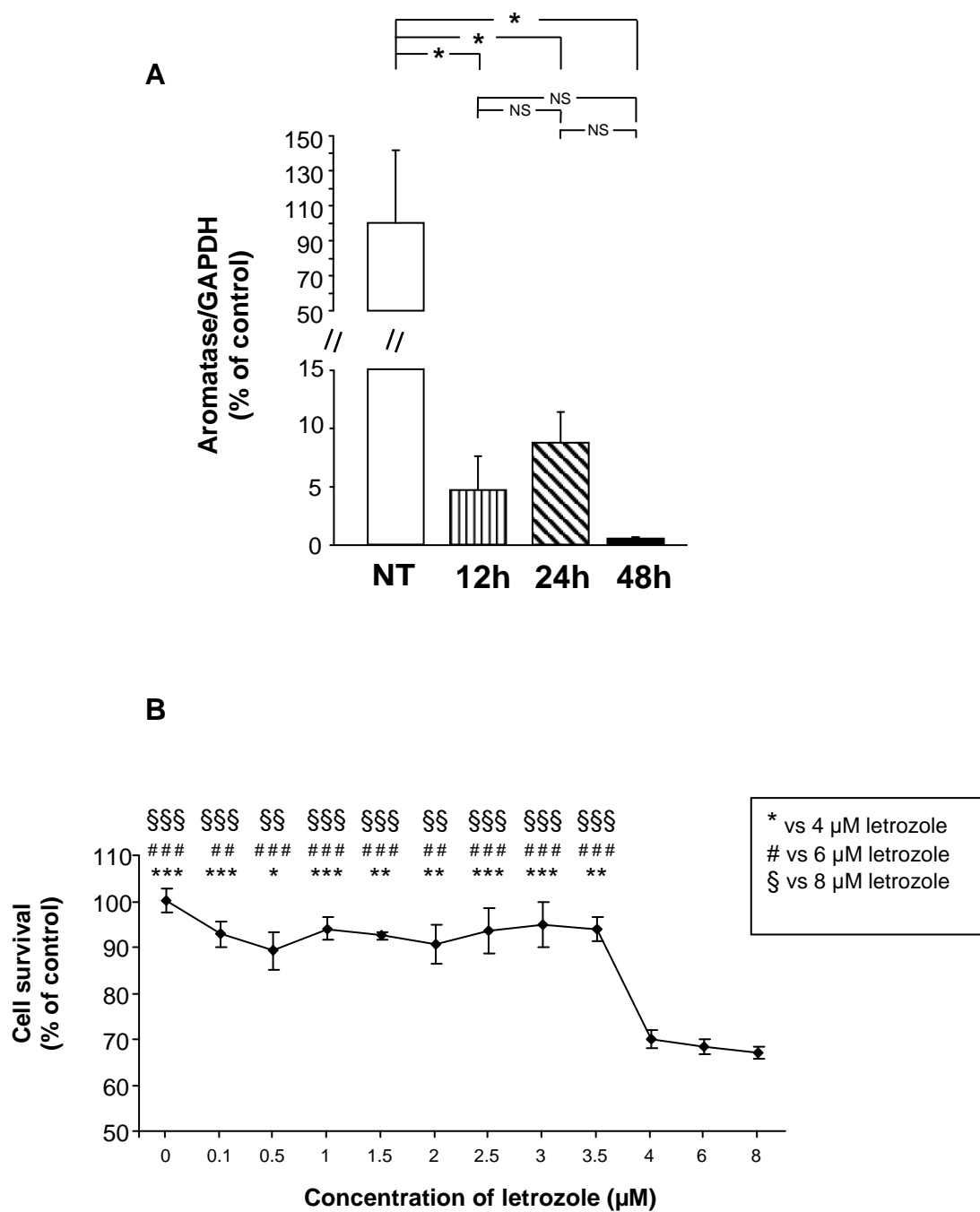
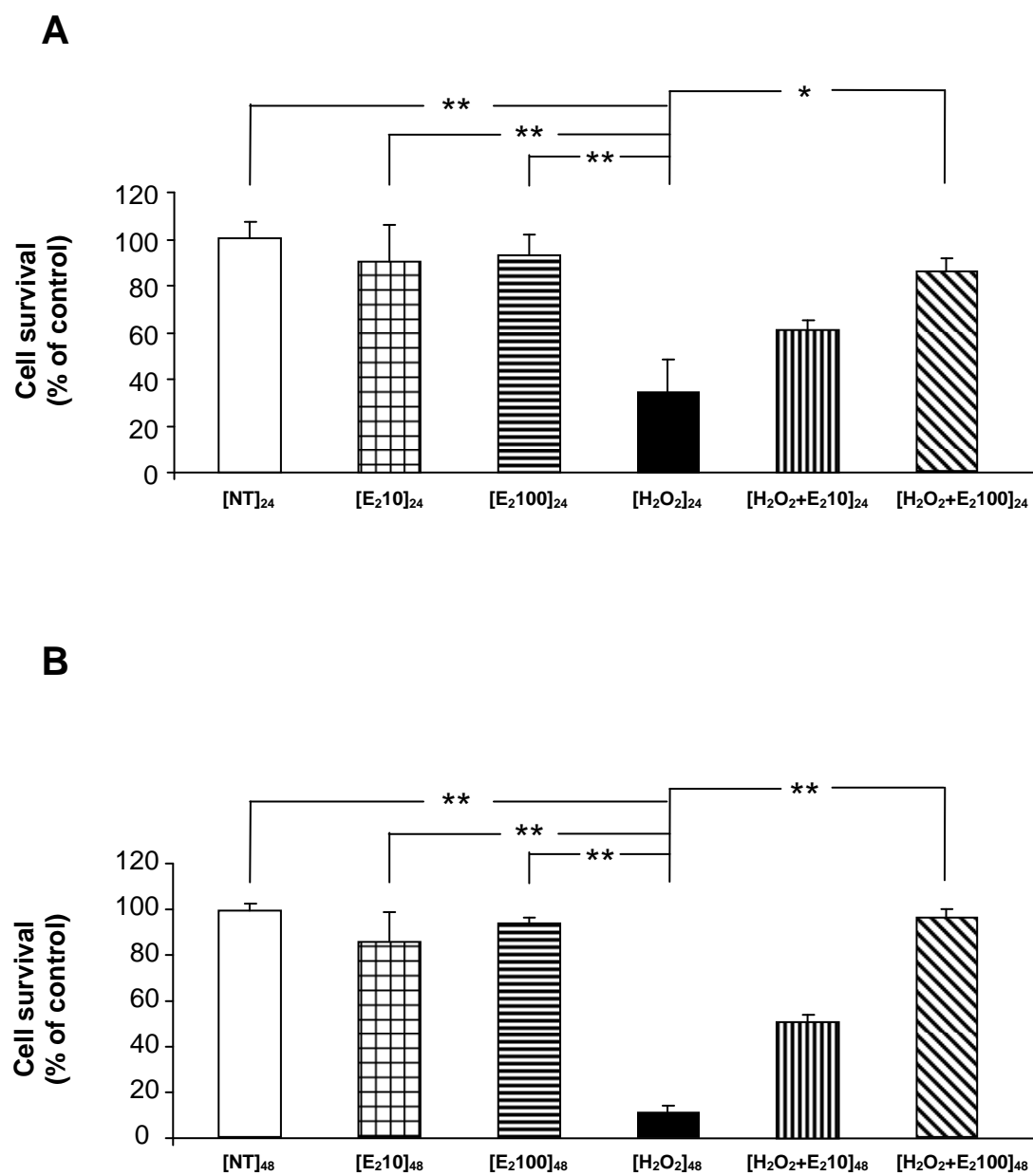
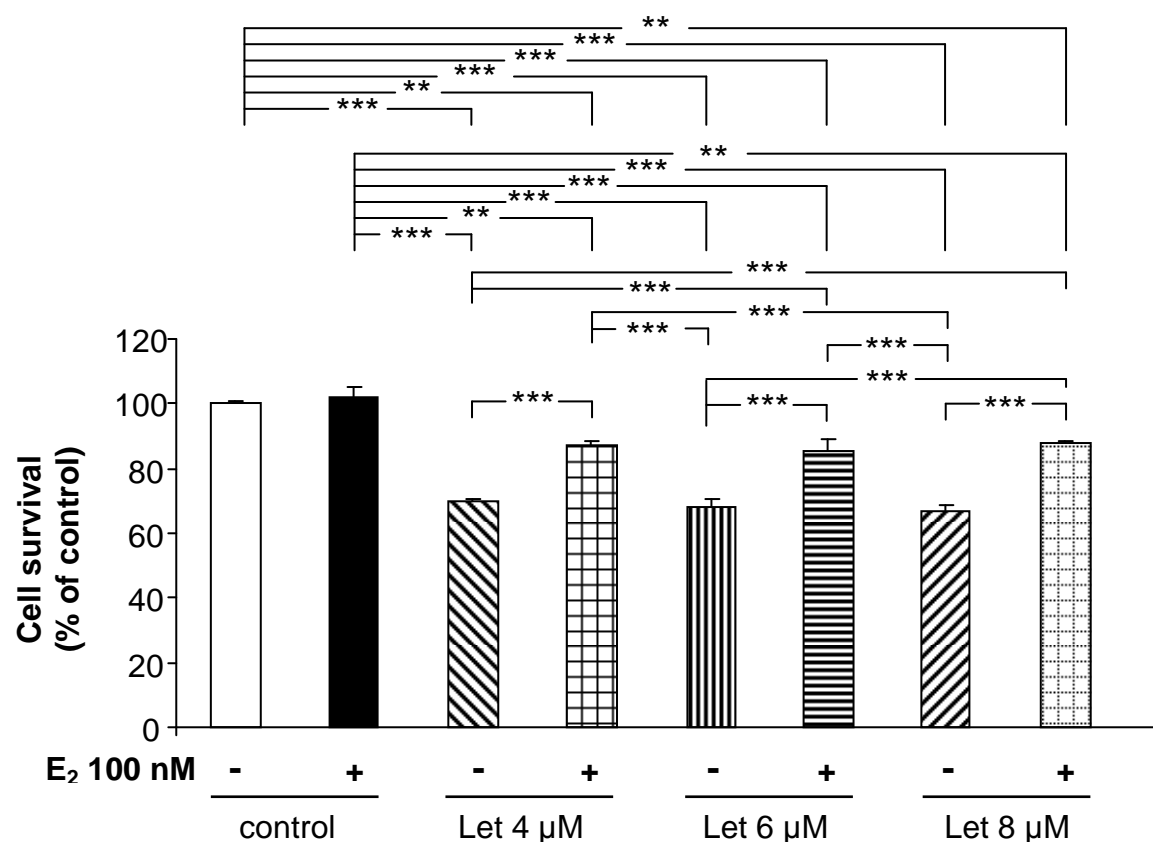


Figure 6



**Figure 7**

**Figure 8**

## **IV. Modifications de la neurostéroïdogenèse évoquées par l'apparition de sites apoptotiques dans les ganglions rachidiens de rats soumis à une douleur neuropathique sciatique**

Nous avons recherché un double objectif en réalisant le travail présenté dans ce chapitre. Nous avons d'abord voulu vérifier si les constrictions de nerfs responsables de douleurs neuropathiques chroniques provoquent à long terme une mort cellulaire dans les structures clés impliquées dans le contrôle de la nociception. Ensuite, nous avons cherché à savoir si des modifications interviennent dans la biosynthèse des neurostéroïdes au moment où apparaissent les foyers ou sites apoptotiques dans les structures nociceptives. Pour ce faire, nous avons utilisé un modèle expérimental de douleur chronique induite chez le rat par ligature lâche du nerf sciatique (Bennett et Xie, 1988) afin d'étudier la cinétique d'apparition des processus apoptotiques dans les ganglions rachidiens et la moelle épinière qui jouent un rôle crucial dans la nociception. Les changements intervenant dans la biosynthèse des neurostéroïdes en fonction du temps ont ensuite été évalués dans les structures nociceptives de rats naïfs, pseudo-opérés et neuropathiques présentant ou non des foyers apoptotiques.

### **IV.1. Evaluation comportementale des seuils de sensibilité nociceptive**

Pour s'assurer que la ligature lâche du nerf sciatique a effectivement induit une douleur neuropathique chronique dans notre modèle expérimental, nous avons réalisé une analyse comportementale avec le Plantar test (ou *Hargreave's behavioral method*) et le von Frey Filament test qui permettent respectivement de mesurer les seuils de sensibilité thermique et mécanique des animaux. Les résultats montrent que la diminution significative des seuils thermique (hyperalgie thermique) et mécanique (allodynie mécanique) détectée sur

la patte ipsilatérale à la ligature dès le 5<sup>ème</sup> jour suivant l'opération persiste jusqu'au 30<sup>ème</sup> jour après induction de la constriction nerveuse. Par ailleurs, la présence de la douleur neuropathique est également indiquée par d'autres paramètres que l'expérimentateur observe tous les jours chez les animaux utilisés à savoir la locomotion, la posture de la patte affectée et l'état des griffes (Bennett et Xie, 1988).

#### **IV.2. Identification des sites apoptotiques dans les ganglions rachidiens et la moelle épinière des rats neuropathiques**

Le test de TUNEL a servi pour l'analyse de la cinétique d'apparition de foyers apoptotiques dans les ganglions rachidiens et la moelle épinière. En faisant une analyse une fois tous les 5 jours sur une durée totale de 30 jours, nous n'avons pas détecté d'apoptose dans la moelle épinière des rats ayant le nerf sciatique ligaturé bien que ces animaux développaient les principaux symptômes caractéristiques de la douleur chronique neuropathique (hyperalgie thermique et allodynie mécanique). En revanche, un foyer apoptotique a été détecté dans un nombre restreint de cellules satellites gliales dans les ganglions rachidiens des rats neuropathiques 30 jours après induction de la neuropathie périphérique.

#### **IV.3. Analyse des changements intervenant dans la neurostéroïdogenèse au moment de l'apparition des sites apoptotiques dans les ganglions rachidiens des rats neuropathiques**

Grâce aux expériences de pulse-chase, d'HPLC et de Flo/One, nous avons observé qu'au moment de l'apparition du foyer apoptotique dans les ganglions rachidiens, seule la biosynthèse d' $[^3\text{H}]$ œstradiol à partir du précurseur  $[^3\text{H}]$ PREG a été modifiée alors que la

production de [ $^3\text{H}$ ]progestérone, de [ $^3\text{H}$ ]17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone, de [ $^3\text{H}$ ]testostérone et de [ $^3\text{H}$ ]3 $\alpha$ -androstane-1,2-diol n'a pas varié. En effet, le taux de [ $^3\text{H}$ ]œstradiol néosynthétisé dans les ganglions ipsilatéraux (contenant quelques cellules satellites gliales apoptotiques) est environ deux fois plus important que celui détecté dans les ganglions contralatéraux à la ligature ou dans les ganglions des rats pseudo-opérés et naïfs. Ces résultats suggèrent que dans les ganglions rachidiens ipsilatéraux des rats neuropathiques, un processus régulateur serait déclenché dans les neurones sensoriels voisins des cellules satellites gliales apoptotiques pour ralentir la perte cellulaire et contribuer aux mécanismes d'adaptation à l'état pathologique chronique.

**L'ensemble des résultats fait l'objet d'un article en préparation. Les figures et illustrations relatives aux résultats décrits se trouvent dans l'exemplaire de l'article joint au mémoire qui permet également d'apporter des informations complémentaires et détaillées sur les résultats.**

**Sciatic nerve injury induces apoptosis of dorsal root ganglion satellite cells  
and selectively modifies neurosteroidogenesis in sensory neurons**

Véronique Schaeffer<sup>a</sup>, Christine Patte-Mensah<sup>a</sup>, Anne Eckert<sup>b</sup>, Ayikoe G. Mensah-Nyagan<sup>a\*</sup>.

<sup>a</sup> Equipe Stéroïdes et Système Nociceptif, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Centre National de la Recherche Scientifique/Université Louis Pasteur, 21 rue René Descartes, 67 084 Strasbourg Cedex, France.

<sup>b</sup> Neurobiology Research Laboratory, Psychiatric University Clinic, Wilhelm Klein-Strasse 27, CH-4025 Basel, Switzerland.

Correspondence should be addressed to Prof. A.G. Mensah-Nyagan, Equipe Stéroïdes et Système Nociceptif, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Centre National de la Recherche Scientifique/Université Louis Pasteur, 21 rue René Descartes, 67084 Strasbourg Cedex, France. Tel: (33) 390 24 14 38, Fax: (33) 388 61 33 47; E-Mail: [gmenhah@neurochem.u-strasbg.fr](mailto:gmenhah@neurochem.u-strasbg.fr).

## Abstract

Various investigations suggested neurosteroid involvement in the control of neurodegenerative processes. However, there is no direct evidence showing that the protection of nerve cells against apoptosis depends on their own capacity to synthesize endogenous neuroprotective neurosteroids. Here, we studied the interactions between neurosteroidogenesis and apoptosis phenomenon occurring in sensory structures of rats subjected to neuropathic pain generated by sciatic nerve chronic constriction injury (CCI). In a first step, the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) allowed us to observe that, up to 30 days after CCI, there was no apoptotic cell in the spinal cord although pain symptoms such as thermal hyperalgesia and mechanical allodynia were revealed by the Hargreaves's behavioral method and von Frey filament tests, respectively. In contrast, the TUNEL assays showed a restricted population of apoptotic satellite glial cells (SGC) in ipsilateral dorsal root ganglia (DRG) of neuropathic rats at day 30 after induction of the CCI. The combination of pulse-chase experiments with high performance liquid chromatography and flow scintillation detection revealed that, among numerous biosynthetic pathways converting [ $^3\text{H}$ ]pregnenolone into various [ $^3\text{H}$ ]neurosteroids, only [ $^3\text{H}$ ]estradiol formation was selectively modified and upregulated in DRG neurons surrounded by apoptotic SGC. The results suggest that endogenously produced neurosteroids such as estradiol may be pivotal for the protection of DRG sensory neurons against sciatic nerve CCI-induced apoptosis.

## Introduction

Several diseases of the nervous system result from the dysregulation of endogenous mechanisms involved in the protection of nerve cells against death. Therefore, the identification of endogenous molecules which play a pivotal role in the regulation of nerve cell viability and neurodegenerative processes may certainly offer interesting possibilities to develop effective neuroprotective therapies. The past three decades were marked by a major finding indicating that neurons and glial cells are capable of synthesizing autonomously bioactive steroids also called neurosteroids (Baulieu et al., 1999; Mensah-Nyagan et al., 1999; Patte-Mensah et al., 2006; Patte-Mensah and Mensah-Nyagan, 2007). Various studies have suggested that neurosteroids may be involved in the control of neurodegenerative mechanisms (Thomas et al., 1999; Griffin et al., 2004; Schumacher et al., 2004; Wang et al., 2005; Brinton and Wang, 2006a,b; Leonelli et al., 2007). However, there is no direct evidence showing that the viability and protection of nerve cells against apoptosis depend on their own ability to produce endogenous neuroprotective neurosteroids. It is well admitted that the rat model of sciatic nerve chronic constriction injury (CCI) reproduces in a pertinent manner various symptoms of neuropathic pain similar to those observed in humans (Bennett and Xie, 1988; Hogan, 2002; Wang and Wang, 2003). In particular, a persistent thermal hyperalgesia and mechanical allodynia are detected in CCI-evoked neuropathic pain rats several weeks or months after induction of the nerve constriction (Bennett and Xie, 1988). It has also been demonstrated that neuronal apoptosis occurs in pivotal nociceptive structures such as the spinal cord (SC) dorsal horn and dorsal root ganglia (DRG) after CCI but these data are subjected to a serious controversy (Whiteside and Munglani, 2001; Maione et al., 2002; Campana and Myers, 2003; de Novellis et al., 2004; Polgár et al., 2005). Indeed, a number of papers, which revealed the occurrence of apoptosis in the SC and DRG in a short period after peripheral nerve injury, suggested a close link between neuronal cell death in nociceptive



structures and the persistence of neuropathic pain (Whiteside and Munglani, 2001; Zimmermann, 2001; Maione et al., 2002; Campana and Myers, 2003). In contrast, other investigations, which showed the absence of neuronal apoptosis in CCI-rat SC, demonstrated that the loss of neurons is not required for the development of neuropathic pain symptoms (Polgár et al., 2003, 2004, 2005). However, it is noteworthy that these latter investigations were mainly focused on the SC and apoptosis occurrence had not been studied in DRG (Polgár et al., 2003, 2004, 2005). Therefore, we decided to use the TUNEL method in order to investigate whether or not apoptosis effectively occurs in DRG and SC of CCI-rats within a period of 30 days following the nerve injury. Because we detected the occurrence of apoptosis in a small population of DRG satellite glial cells (SGC) at day 30 after the CCI, we sought to determine whether the phenomenon interferes with neurosteroidogenic ability of sensory neurons surrounded by apoptotic SGC. To reach this goal, we combined pulse-chase experiments, HPLC analyses and flow-scintillation detection (Mensah-Nyagan et al., 1994, 1996a,b; Patte-Mensah et al., 2003, 2005; Kibaly et al., 2005, 2007) to investigate the conversion of the precursor tritiated pregnenolone ( $[^3\text{H}]\text{PREG}$ ) into various  $[^3\text{H}]$ neurosteroids in DRG isolated from the lumbo-sacral region of naive, sham-operated and CCI-rats at day 30 after the nerve constriction.

## **Materials and methods**

### **Animals**

Adult male Sprague-Dawley rats weighting 225-249 g were used in this study. Animal care and manipulations were performed according to the European Community Council directives (86/609/EC) and under the supervision of authorized investigators. The animals were obtained from a commercial source (Janvier, Le Genest-St-Isle, France) and housed

under standard laboratory conditions in a 12-h light/dark cycle with food and water ad libitum. Surgical operations were made under ketamine (75 mg/kg)/xylazine (5 mg/kg) anesthesia. Neuropathic pain was induced by sciatic nerve chronic constriction injury (CCI) according to the protocol described by Bennett and Xie (1988). All experiments followed the International Association for the Study of Pain ethical guidelines (Zimmermann, 1983). Briefly, after dissection at the middle of the thigh, 4-5 mm of the common sciatic nerve was tied loosely with 4 ligatures spaced by 1 mm. Various groups of control rats were used: some were not operated upon (naive rats) and others were sham-operated (exposure of the right or left sciatic nerve without ligature). The animals were inspected every day to observe their recovery from the surgical operation and parameters indicating the occurrence of neuropathic pain including the gait, posture of the affected hind paw and condition of claws (Bennett and Xie, 1988). Animals were euthanized 5, 10, 15, 20, 25 or 30 days after induction of the sciatic nerve CCI in order to perform biochemical experiments. Before the sacrifice, nociceptive behavioral analyses were performed to check the presence or absence of neuropathic pain symptoms such as thermal hyperalgesia and mechanical allodynia.

### **Chemicals and reagents**

Synthetic steroids including progesterone (PROG), pregnenolone (PREG), 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone (17OHPROG), testosterone, 3 $\alpha$ -androstenediol (3 $\alpha$ DIOL) and 17 $\beta$ -estradiol were purchased from Steraloids (Newport, RI, USA). Dichloromethane (DCM) was from Acros Organics (Noisy Le Grand, France). Hexane and isopropanol were obtained from Fischer Bioblock Scientific (Illkirch, France). Propylene Glycol and Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) were supplied from Sigma (St Louis, MO, USA). Tritiated steroids such as 7-<sup>3</sup>H(N)-pregnenolone ([<sup>3</sup>H]PREG), 1,2,6,7-<sup>3</sup>H(N)-progesterone ([<sup>3</sup>H]PROG), 9,11,12-<sup>3</sup>H(N)-testosterone and 9,11-<sup>3</sup>H(N)-3 $\alpha$ -androstenediol ([<sup>3</sup>H]3 $\alpha$ DIOL) were obtained

from PerkinElmer (Boston, MA, USA).  $17\alpha$ -hydroxy-[1,2,6,7- $^3\text{H}$ ]-progesterone ( $[^3\text{H}]17\text{OHPROG}$ ) was purchased from Amersham (Piscataway, NJ, USA).

### **Nociceptive behavioral tests**

Thermal hyperalgesia was assessed by using a Plantar test apparatus (Ugo Basile, Comerio, Italy) which measures the paw withdrawal latency in response to radiant heat (Hargreaves et al., 1988). The rats were first allowed to habituate to the experimental room for at least 2 h and then to the apparatus for 10 min before testing. Each rat was placed individually in clear Plexiglas® boxes (23 x 18 x 14 cm) positioned on a clear plastic surface. The heat source was then positioned under the plantar surface of the hind paw and activated with an infra-red light beam. The heat source is connected to a timer which automatically switched off the heat when the paw was withdrawn. A cut-off time of 20 s was used to prevent tissue damage in absence of response. The mean paw withdrawal latencies (in seconds) for the ipsilateral and contralateral hind paws were determined from an average of three separate measures on each hind paw (a total of 6 measures per animal) at a given time point. The testing box was thoroughly cleaned between each test session.

The mechanical nociceptive sensitivity threshold was evaluated in individual rats placed on Plexiglas® boxes (30 x 30 x 25 cm) upon an elevated metal grid allowing access to the plantar surface of the hind paws. The presence of mechanical allodynia was assessed using a series of calibrated von Frey hairs (4, 6, 8, 10, 15, 26, 60, 100, 180 and 300 g; Stoelting, Wood Dale, IL, USA), which were applied to the plantar surface of the hind paw with increasing force until the individual filament used just started to bend. The filament was applied for a period of 1-2 s and the procedure was repeated five times at 4-5 s intervals. The threshold for paw withdrawal was calculated by taking the average of five repeated stimuli (in

g), which induced a reflex paw withdrawal. Thus, at a given time point, five measures were obtained from each hind paw (a total of 10 measures per animal).

In all behavioral experiments, both thermal and mechanical thresholds were measured in individual rats using the Plantar test followed by the von Frey filament tests.

### **Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) assay**

Animals were deeply anaesthetized with 25% urethane (0.5 ml/100g i.p.) and perfused transcardially with 100 ml of 0.1 M phosphate buffered (PB; pH 7.4). The perfusion was carried out with 450 ml of fixative solution (4% paraformaldehyde in PB). The spinal cord and DRG from lumbo-sacral region were rapidly dissected and post fixed in the same fixative solution for 24 h. The tissues were immersed in PB containing 15% sucrose for 12 h and then transferred into 30% sucrose in PB for 24 h. After that, the tissues were placed in embedding medium (OCT, Tissue-Tek, Reichert-Jung, Nussloch, Germany) and immediately frozen at -80°C. Coronal sections (10-µm thick) were cut in a cryostat HM 560 (Microm, Francheville, France) and mounted on glass slides coated with gelatin and chromium potassium sulfate.

Apoptotic cell death was detected using the in situ Cell Death detection kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. Briefly, after permeabilisation with PB containing 0.5% triton X-100, sections were incubated with the TUNEL reaction mixture containing terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) and dUTP coupled to fluorescein for 60 min at 37°C. Negative controls were performed by omitting TdT. Then, the sections were rinsed with PB and mounted in vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). The preparations were examined under a fluorescence DMR microscope equipped with a digital camera assisted by a pentium IV PC computer (Leica, Wetzlar, Germany).

### **Pulse chase experiments**

For each experiment, lumbo-sacral DRG were pre-incubated for 15 min in 2 ml 0.9% NaCl at 37°C. The DRG were incubated at 37°C for 3 h in 1.5 ml of DMEM (pH 7.4) containing 100 nM [<sup>3</sup>H]PREG supplemented with 1% propylene glycol. The incubation with [<sup>3</sup>H]PREG was made in a water-saturated atmosphere (95% air, 5% CO<sub>2</sub>) which made it possible to maintain the pH at 7.4. At the end of the incubation period, the reaction was stopped by adding 0.5 ml of ice-cold DMEM and transferring the tubes into a cold water bath (0°C). Newly-synthesized neurosteroids released by the DRG were extracted from the incubation medium three times with 2 ml of DCM and the organic phase was evaporated on ice under a stream of nitrogen. The dry extracts were redissolved in 2 ml of hexane and prepurified on Sep-Pak C<sub>18</sub> cartridges (Waters Associates, Milford, MA, USA). Steroids were eluted with a solution made of 50% isopropanol and 50% hexane. The solvent was evaporated in a RC-10-10 Speed Vac Concentrator and the dry extracts were kept at -20°C until HPLC analysis. The extraction efficiency was 89 ± 7%.

### **HPLC-Flo/One characterization of steroids**

The newly-synthesized steroids extracted from the incubation medium already purified on Sep-Pak cartridges were characterized using a previously validated method which combines HPLC analysis and flow-scintillation detection (Mensah-Nyagan et al., 1994, 1996a,b; Patte-Mensah et al., 2003, 2004, 2005; Kibaly et al., 2005, 2007; Schaeffer et al., 2006). Briefly, the prepurified extracts were analyzed by reversed-phase HPLC on a Gilson liquid chromatograph (322 pump, UV/VIS 156 detector, Unipoint system, Gilson, Middleton, WI, USA) equipped with a 4.6 × 250 mm SymetryShield C<sub>18</sub> column (Waters Associates) equilibrated with 100% hexane. The radioactive steroids were eluted at a flow rate of 0.5 ml/min using a gradient of isopropanol (0-60% over 65 min) including 5 isocratic steps at 0%

(0-10 min), 1% (30-35 min), 2% (40-45 min), 30% (50-55 min) and 60% (60-65 min). The tritiated steroids eluted from the HPLC column were directly quantified with a flow-scintillation analyzer (Radiomatic Flo/One-Beta A 500, Packard Instruments, Meriden, CT, USA) equipped with a Pentium IV PC computer for measurement of the percentage of total radioactivity contained in each peak. Synthetic steroids used as reference standards were chromatographed under the same conditions as the extracts obtained from the cell incubation media and their elution positions were determined by ultraviolet absorption using a UV/VIS 156 detector (Gilson).

The elution positions of steroids change on analytic columns after the purification of a certain number of tissue extracts. Therefore, to optimize the characterization of newly-synthesized neurosteroids, synthetic tritiated neuroactive steroids including [ $^3\text{H}$ ]PREG, [ $^3\text{H}$ ]PROG, [ $^3\text{H}$ ]testosterone, [ $^3\text{H}$ ]estradiol and [ $^3\text{H}$ ]3 $\alpha$ DIOL were also used as reference standards, chromatographed under the same conditions as the extracts and identified by their elution times with the Flo/One computer system before and after each extract analytic run.

### **Quantification of steroid biosynthesis**

The amount of radioactive steroids formed by the conversion of [ $^3\text{H}$ ]PREG was calculated as a percentage of the total radioactivity contained in all peaks resolved by the HPLC-Flo/One system, including [ $^3\text{H}$ ]PREG itself.

### **Statistical analyses**

Statistical analyses were performed with the 5.1. version of Statistica software (Statsoft, Maison Alfort, France). ANOVAs followed by Tuckey post-hoc comparisons were used.

## Results

### Behavioral assessment of neuropathic pain symptoms

Prior to animal sacrifice and biochemical investigations, nociceptive behavioral tests were performed to check the presence or absence of neuropathic pain symptoms in CCI-rats and control animals used in the study. A marked thermal hyperalgesia ( $p < 0.001$ ) and a mechanical allodynia ( $p < 0.001$ ) were detected on the ipsilateral paw to the CCI during 30 days following the sciatic nerve constriction (Fig. 1). The withdrawal latency characterizing the thermal pain threshold was generally around  $11.5 \pm 0.5$  s on each paw of sham-operated rats and on the contralateral paw of neuropathic animals. On the ipsilateral paw of sciatic neuropathic rats, the withdrawal latency to the thermal stimulations was around  $6.5 \pm 0.5$  s (Fig. 1A). Similarly, the mechanical nociceptive threshold was also reduced in neuropathic rats from day 5 to 30 after the sciatic nerve CCI (Fig. 1B).

### Detection of apoptosis in the spinal cord and DRG of neuropathic rats

As shown in Fig. 2, no TUNEL-positive cell has been detected in the SC of CCI-rats and control animals at any given time point investigated within the 30 days period following the induction of sciatic nerve constriction. In contrast, TUNEL-staining indicating the occurrence of apoptotic cell death was detected in ipsilateral DRG of CCI-rats 30 days after the sciatic nerve ligation (Fig. 3). Morphological analysis based on the identification criteria reviewed by Hanani (Hanani, 2005) showed that the TUNEL-staining is only expressed in satellite glial cells located on the medio-lateral zone of the DRG (Fig. 3F,H,K). No TUNEL-immunoreactive cells were visualized in contralateral DRG isolated from neuropathic rats as well as in DRG obtained from sham-operated or naive rats (Fig. 3E,G,I). Control experiments

performed by incubating SC or DRG sections with the TUNEL reaction mixture without TdT also showed the absence of labeling at any given time point investigated (Fig. 2I,J and 3J).

### **Neurosteroidogenesis in DRG**

The biosynthesis of neurosteroids was investigated in DRG of naive, sham-operated and CCI-induced neuropathic pain rats at day 30 after sciatic nerve constriction because the restricted apoptotic site occurred in ipsilateral DRG of CCI-rats at this time point (Fig. 3F,H). Qualitative analysis performed with the HPLC-Flo/One system revealed that a 3 h-incubation of DRG with the precursor [ $^3\text{H}$ ]PREG yielded the formation of various radioactive metabolites including [ $^3\text{H}$ ]PROG, [ $^3\text{H}$ ]testosterone, [ $^3\text{H}$ ]3 $\alpha$ DIOL, [ $^3\text{H}$ ]17OHPROG and [ $^3\text{H}$ ]estradiol in all groups of animals (Fig. 4A-D). Quantitative assessments were performed in order to compare the amounts of each [ $^3\text{H}$ ]metabolite generated from the precursor [ $^3\text{H}$ ]PREG in DRG of naive, sham-operated and neuropathic rats (Fig. 5). The amount of newly-synthesized [ $^3\text{H}$ ]PROG was higher in ipsilateral DRG of CCI-rats compared to sham-operated and naive rats (Fig. 5A) but no significant difference was detected when the comparison was made between ipsilateral and contralateral DRG of CCI-rats (Fig. 5A). The levels of [ $^3\text{H}$ ]17OHPROG, [ $^3\text{H}$ ]testosterone and [ $^3\text{H}$ ]3 $\alpha$ DIOL produced from [ $^3\text{H}$ ]PREG were not modified in DRG under CCI-induced neuropathic pain situation (Fig. 5B-D). In contrast, sciatic nerve CCI-evoked neuropathic pain significantly increased the amount of newly-synthesized [ $^3\text{H}$ ]estradiol in ipsilateral DRG containing the restricted apoptotic site compared to contralateral (+76%), sham-operated (+67%) and naive DRG (+118%) (Fig. 5E).



## Discussion

Neuropathic pain results from both abnormal excitability of sensory neurons and pathological changes within the central nervous system. In particular, it is well demonstrated that peripheral nerve injury often leads to neuropathic pain through induction of biochemical and functional changes in DRG and SC dorsal horn which play a crucial role in nociception and pain (Bennett and Xie, 1988; Kingery, 1997; Koltzenburg, 1998; Woolf and Mannion, 1999; Bennett, 2003). One of the mechanisms that is thought to contribute to chronic neuropathic pain is apoptotic cell death intervening in DRG and/or SC after peripheral nerve injury (Whiteside and Munglani, 2001; Zimmermann, 2001; Maione et al., 2002; Campana and Myers, 2003). However, an important controversy exists in the literature about the involvement of apoptosis in the generation of neuropathic pain evoked by peripheral nerve injury. Indeed, using various experimental models of nerve injury including the sciatic nerve CCI, several groups, which showed the occurrence of neuronal and/or glial cell loss in the DRG and/or SC dorsal horn, have correlated this phenomenon with the generation of chronic neuropathic pain (Azkue et al., 1998; Whiteside and Munglani, 2001; Maione et al., 2002; de Novellis et al., 2004). In contrast, Polgár et al. (2003, 2004) reported the absence of neuronal loss in the rat SC dorsal horn by using the sciatic CCI model of neuropathic pain proposed by Bennett and Xie (1988). Moreover, it has been demonstrated that the loss of neurons in the SC dorsal horn is not required for the development of tactile allodynia in the spared nerve injury model of neuropathic pain (Polgár et al., 2005). Therefore, prior to the investigation of the possible interactions between the process of neurosteroid biosynthesis and apoptosis occurrence in nociceptive structures of sciatic nerve CCI-rats, we performed a time-course study using the TUNEL method to search for the presence of apoptotic site in DRG and SC of neuropathic and control animals. Our results revealed an apoptotic cell death in a restricted

zone of ipsilateral DRG to the CCI but not in the SC. Based on the morphological identification criteria reviewed by Hanani (2005), our data suggest that the TUNEL-positive or apoptotic cells correspond to a small population of satellite glial cells in DRG. However, further analysis based on double-labeling experiments with specific markers of satellite cells and neurons (Kennedy, 1982; Nagle, 1988; Miller et al., 2002; Weick et al., 2003) will help in the future to formally identify the cell types containing the TUNEL-staining in DRG. Although the presence of neuropathic pain symptoms such as thermal hyperalgesia and mechanical allodynia were evidenced in CCI-rats at each given time point (days 5, 10, 15, 20, 25, 30) investigated after the sciatic nerve constriction, the occurrence of apoptosis has been observed in DRG only at day 30. Therefore, it appears that in our hands, induction of peripheral nerve injury in rats clearly leads to apoptosis in DRG. Our results also suggest that apoptotic cell death is not required for the generation of CCI-evoked neuropathic pain but may contribute to its aggravation. To determine whether or not the occurrence of pro-apoptotic elements in satellite glial cells impacts on neurosteroidogenic ability of DRG sensory neurons, we investigated their capacity to convert the precursor [ $^3\text{H}$ ]pregnenolone into various neurosteroids thanks to the combination of pulse-chase experiments with HPLC analysis and flow scintillation detection (Mensah-Nyagan et al., 1994, 1996a,b; Patte-Mensah et al., 2003, 2004, 2005; Kibaly et al., 2005, 2007; Schaeffer et al., 2006). Along the neurosteroid biosynthetic pathways converting [ $^3\text{H}$ ]pregnenolone into several metabolites, only the neosynthesis of [ $^3\text{H}$ ]estradiol was significantly increased in DRG containing apoptotic satellite glial cells. This result suggests that, through a paracrine or a cross-talk mechanism, pro-apoptotic factors induced in DRG satellite glial cells by sciatic nerve CCI, produce in DRG sensory neurons a selective increase of the activity of aromatase, the key estradiol-synthesizing enzyme. Additional works will be necessary to confirm this hypothesis, particularly a comparative analysis of aromatase gene and protein expression in DRG isolated

from CCI-, sham-operated and naive rats. However, owing to the well-demonstrated neuroprotective effect exhibited by the neurosteroid estradiol in several experimental models (Garcia-Segura et al., 1999a,b, 2001, 2003; Azcoitia et al., 2001; McCullough et al., 2003; Veiga et al., 2005; Fester et al., 2006), it is possible to speculate that the up-regulation of estradiol production in sensory neurons surrounded by apoptotic satellite cells may be an adaptive mechanism triggered by these neurons to protect themselves against death. This suggestion is supported by the data indicating that dysfunctions evoked in DRG neurons by peripheral nerve injury are sufficient to generate neuropathic pain symptoms the etiology of which does not require the death of sensory neurons (Polgár et al., 2003, 2004, 2005).

Our results also showed that progesterone synthesis was stimulated in DRG of CCI-rats compared to sham-operated animals. But we did not detect a significant difference between the amounts of [ $^3\text{H}$ ]progesterone newly-synthesized from [ $^3\text{H}$ ]pregnenolone in ipsilateral and contralateral DRG of CCI-rats. It is possible that this absence of difference results from a statistical bias because progesterone was also identified as a neuroprotective neurosteroid the increase of which may contribute to anti-apoptotic adaptive mechanisms triggered in DRG neurons surrounded by satellite dying cells (Koenig et al., 1995; Ghoumari et al., 2003; Leonelli et al., 2007; Schumacher et al., 2007).

In conclusion, the present report demonstrates the occurrence of a selective regulation of neurosteroid biosynthetic pathways in DRG neurons after a sciatic nerve injury which induced apoptosis of satellite glial cells and evoked chronic neuropathic pain. The results also suggest the involvement of endogenous neurosteroids in the control of neurodegenerative processes in DRG.

## Acknowledgements

This work was supported by grants from Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, France) and Université Louis Pasteur (Strasbourg, France). VS was the recipient of a fellowship from the Neuroscience Upper Rhine Network Neurex. Special thanks to P. Piguet and S. Klipfel of Neurex.

## References

- Azcoitia I, Sierra A, Veiga S, Honda S, Harada N, Garcia-Segura LM. 2001. Brain aromatase is neuroprotective. *J Neurobiol* 47:318-329.
- Azkue JJ, Zimmermann M, Hsieh TF, Herdegen T. 1998. Peripheral nerve insult induces NMDA receptor-mediated, delayed degeneration in spinal neurons. *Eur J Neurosci* 10:2204-2206.
- Baulieu EE, Robel P, Schumacher M. 1999. *Contemporary Endocrinology*. Totowa, NJ: Humana Press.
- Bennett GJ. 2003. Neuropathic pain: a crisis of definition? *Anesth Analg* 97:619-620.
- Bennett GJ, Xie YK. 1988. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33:87-107.
- Brinton RD, Wang JM. 2006a. Preclinical analyses of the therapeutic potential of allopregnanolone to promote neurogenesis in vitro and in vivo in transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 3:11-17.
- Brinton RD, Wang JM. 2006b. Therapeutic potential of neurogenesis for prevention and recovery from Alzheimer's disease: allopregnanolone as a proof of concept neurogenic agent. *Curr Alzheimer Res* 3:185-190.

- Campana WM, Myers RR. 2003. Exogenous erythropoietin protects against dorsal root ganglion apoptosis and pain following peripheral nerve injury. *Eur J Neurosci* 18:1497-1506.
- de Novellis V, Siniscalco D, Galderisi U, Fuccio C, Nolano M, Santoro L, Cascino A, Roth KA, Rossi F, Maione S. 2004. Blockade of glutamate mGlu5 receptors in a rat model of neuropathic pain prevents early over-expression of pro-apoptotic genes and morphological changes in dorsal horn lamina II. *Neuropharmacology* 46:468-479.
- Fester L, Ribeiro-Gouveia V, Prange-Kiel J, von Schassen C, Bottner M, Jarry H, Rune GM. 2006. Proliferation and apoptosis of hippocampal granule cells require local oestrogen synthesis. *J Neurochem* 97:1136-1144.
- Garcia-Segura LM, Azcoitia I, DonCarlos LL. 2001. Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol* 63:29-60.
- Garcia-Segura LM, Naftolin F, Hutchison JB, Azcoitia I, Chowen JA. 1999a. Role of astroglia in estrogen regulation of synaptic plasticity and brain repair. *J Neurobiol* 40:574-584.
- Garcia-Segura LM, Veiga S, Sierra A, Melcangi RC, Azcoitia I. 2003. Aromatase: a neuroprotective enzyme. *Prog Neurobiol* 71:31-41.
- Garcia-Segura LM, Wozniak A, Azcoitia I, Rodriguez JR, Hutchison RE, Hutchison JB. 1999b. Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair. *Neuroscience* 89:567-578.
- Ghoumari AM, Dusart I, El-Etr M, Tronche F, Sotelo C, Schumacher M, Baulieu EE. 2003. Mifepristone (RU486) protects Purkinje cells from cell death in organotypic slice cultures of postnatal rat and mouse cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7953-7958.

- Griffin LD, Gong W, Verot L, Mellon SH. 2004. Niemann-Pick type C disease involves disrupted neurosteroidogenesis and responds to allopregnanolone. *Nat Med* 10:704-711.
- Hanani M. 2005. Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. *Brain Res Brain Res Rev* 48:457-476.
- Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. 1988. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 32:77-88.
- Hogan Q. 2002. Animal pain models. *Reg Anesth Pain Med* 27:385-401.
- Kennedy PG. 1982. Neural cell markers and their applications to neurology. *J Neuroimmunol* 2:35-53.
- Kibaly C, Meyer L, Patte-Mensah C, Mensah-Nyagan AG. 2007. Biochemical and functional evidence for the control of pain mechanisms by dehydroepiandrosterone endogenously synthesized in the spinal cord. *Faseb J* doi: 10.1096/fj.07-8930com:
- Kibaly C, Patte-Mensah C, Mensah-Nyagan AG. 2005. Molecular and neurochemical evidence for the biosynthesis of dehydroepiandrosterone in the adult rat spinal cord. *J Neurochem* 93:1220-1230.
- Kingery WS. 1997. A critical review of controlled clinical trials for peripheral neuropathic pain and complex regional pain syndromes. *Pain* 73:123-139.
- Koenig HL, Schumacher M, Ferzaz B, Thi AN, Ressouches A, Guennoun R, Jung-Testas I, Robel P, Akwa Y, Baulieu EE. 1995. Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann cells. *Science* 268:1500-1503.
- Koltzenburg M. 1998. Painful neuropathies. *Curr Opin Neurol* 11:515-521.
- Leonelli E, Bianchi R, Cavaletti G, Caruso D, Crippa D, Garcia-Segura LM, Lauria G, Magnaghi V, Roglio I, Melcangi RC. 2007. Progesterone and its derivatives are

- neuroprotective agents in experimental diabetic neuropathy: a multimodal analysis. *Neuroscience* 144:1293-1304.
- Maione S, Siniscalco D, Galderisi U, de Novellis V, Uliano R, Di Bernardo G, Berrino L, Cascino A, Rossi F. 2002. Apoptotic genes expression in the lumbar dorsal horn in a model neuropathic pain in rat. *Neuroreport* 13:101-106.
- McCullough LD, Blizzard K, Simpson ER, Oz OK, Hurn PD. 2003. Aromatase cytochrome P450 and extragonadal estrogen play a role in ischemic neuroprotection. *J Neurosci* 23:8701-8705.
- Mensah-Nyagan AG, Do-Rego JL, Beaujean D, Luu-The V, Pelletier G, Vaudry H. 1999. Neurosteroids: expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the central nervous system. *Pharmacol Rev* 51:63-81.
- Mensah-Nyagan AG, Do-Rego JL, Feuilloley M, Marcual A, Lange C, Pelletier G, Vaudry H. 1996a. In vivo and in vitro evidence for the biosynthesis of testosterone in the telencephalon of the female frog. *J Neurochem* 67:413-422.
- Mensah-Nyagan AG, Feuilloley M, Do-Rego JL, Marcual A, Lange C, Tonon MC, Pelletier G, Vaudry H. 1996b. Localization of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase and characterization of testosterone in the brain of the male frog. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:1423-1428.
- Mensah-Nyagan AG, Feuilloley M, Dupont E, Do-Rego JL, Leboulenger F, Pelletier G, Vaudry H. 1994. Immunocytochemical localization and biological activity of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the central nervous system of the frog. *J Neurosci* 14:7306-7318.
- Miller KE, Richards BA, Kriebel RM. 2002. Glutamine-, glutamine synthetase-, glutamate dehydrogenase- and pyruvate carboxylase-immunoreactivities in the rat dorsal root ganglion and peripheral nerve. *Brain Res* 945:202-211.

- Nagle RB. 1988. Intermediate filaments: a review of the basic biology. *Am J Surg Pathol* 12 Suppl 1:4-16.
- Patte-Mensah C, Kappes V, Freund-Mercier MJ, Tsutsui K, Mensah-Nyagan AG. 2003. Cellular distribution and bioactivity of the key steroidogenic enzyme, cytochrome P450side chain cleavage, in sensory neural pathways. *J Neurochem* 86:1233-1246.
- Patte-Mensah C, Kibaly C, Boudard D, Schaeffer V, Begle A, Saredi S, Meyer L, Mensah-Nyagan AG. 2006. Neurogenic pain and steroid synthesis in the spinal cord. *J Mol Neurosci* 28:17-31.
- Patte-Mensah C, Kibaly C, Mensah-Nyagan AG. 2005. Substance P inhibits progesterone conversion to neuroactive metabolites in spinal sensory circuit: a potential component of nociception. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:9044-9049.
- Patte-Mensah C, Li S, Mensah-Nyagan AG. 2004. Impact of neuropathic pain on the gene expression and activity of cytochrome P450side-chain-cleavage in sensory neural networks. *Cell Mol Life Sci* 61:2274-2284.
- Patte-Mensah C, Mensah-Nyagan AG. 2007. Peripheral neuropathy and neurosteroid formation in the central nervous system. *Brain Res Rev*
- Polgár E, Gray S, Riddell JS, Todd AJ. 2004. Lack of evidence for significant neuronal loss in laminae I-III of the spinal dorsal horn of the rat in the chronic constriction injury model. *Pain* 111:144-150.
- Polgár E, Hughes DI, Arham AZ, Todd AJ. 2005. Loss of neurons from laminae I-III of the spinal dorsal horn is not required for development of tactile allodynia in the spared nerve injury model of neuropathic pain. *J Neurosci* 25:6658-6666.
- Polgár E, Hughes DI, Riddell JS, Maxwell DJ, Puskar Z, Todd AJ. 2003. Selective loss of spinal GABAergic or glycinergic neurons is not necessary for development of thermal



- hyperalgesia in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Pain* 104:229-239.
- Schaeffer V, Patte-Mensah C, Eckert A, Mensah-Nyagan AG. 2006. Modulation of neurosteroid production in human neuroblastoma cells by Alzheimer's disease key proteins. *J Neurobiol* 66:868-881.
- Schumacher M, Guennoun R, Ghoumari A, Massaad C, Robert F, El-Etr M, Akwa Y, Rajkowski K, Baulieu EE. 2007. Novel perspectives for progesterone in hormone replacement therapy, with special reference to the nervous system. *Endocr Rev* 28:387-439.
- Schumacher M, Guennoun R, Robert F, Carelli C, Gago N, Ghoumari A, Gonzalez Deniselle MC, Gonzalez SL, Ibanez C, Labombarda F, Coirini H, Baulieu EE, De Nicola AF. 2004. Local synthesis and dual actions of progesterone in the nervous system: neuroprotection and myelination. *Growth Horm IGF Res* 14 Suppl A:S18-33.
- Thomas AJ, Nockels RP, Pan HQ, Shaffrey CI, Chopp M. 1999. Progesterone is neuroprotective after acute experimental spinal cord trauma in rats. *Spine* 24:2134-2138.
- Veiga S, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. 2005. Extragonadal synthesis of estradiol is protective against kainic acid excitotoxic damage to the hippocampus. *Neuroreport* 16:1599-1603.
- Wang JM, Johnston PB, Ball BG, Brinton RD. 2005. The neurosteroid allopregnanolone promotes proliferation of rodent and human neural progenitor cells and regulates cell-cycle gene and protein expression. *J Neurosci* 25:4706-4718.
- Wang LX, Wang ZJ. 2003. Animal and cellular models of chronic pain. *Adv Drug Deliv Rev* 55:949-965.

- Weick M, Cherkas PS, Hartig W, Pannicke T, Uckermann O, Bringmann A, Tal M, Reichenbach A, Hanani M. 2003. P2 receptors in satellite glial cells in trigeminal ganglia of mice. *Neuroscience* 120:969-977.
- Whiteside GT, Munglani R. 2001. Cell death in the superficial dorsal horn in a model of neuropathic pain. *J Neurosci Res* 64:168-173.
- Woolf CJ, Mannion RJ. 1999. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet* 353:1959-1964.
- Zimmermann M. 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16:109-110.
- Zimmermann M. 2001. Pathobiology of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 429:23-37.

## Figure Legends

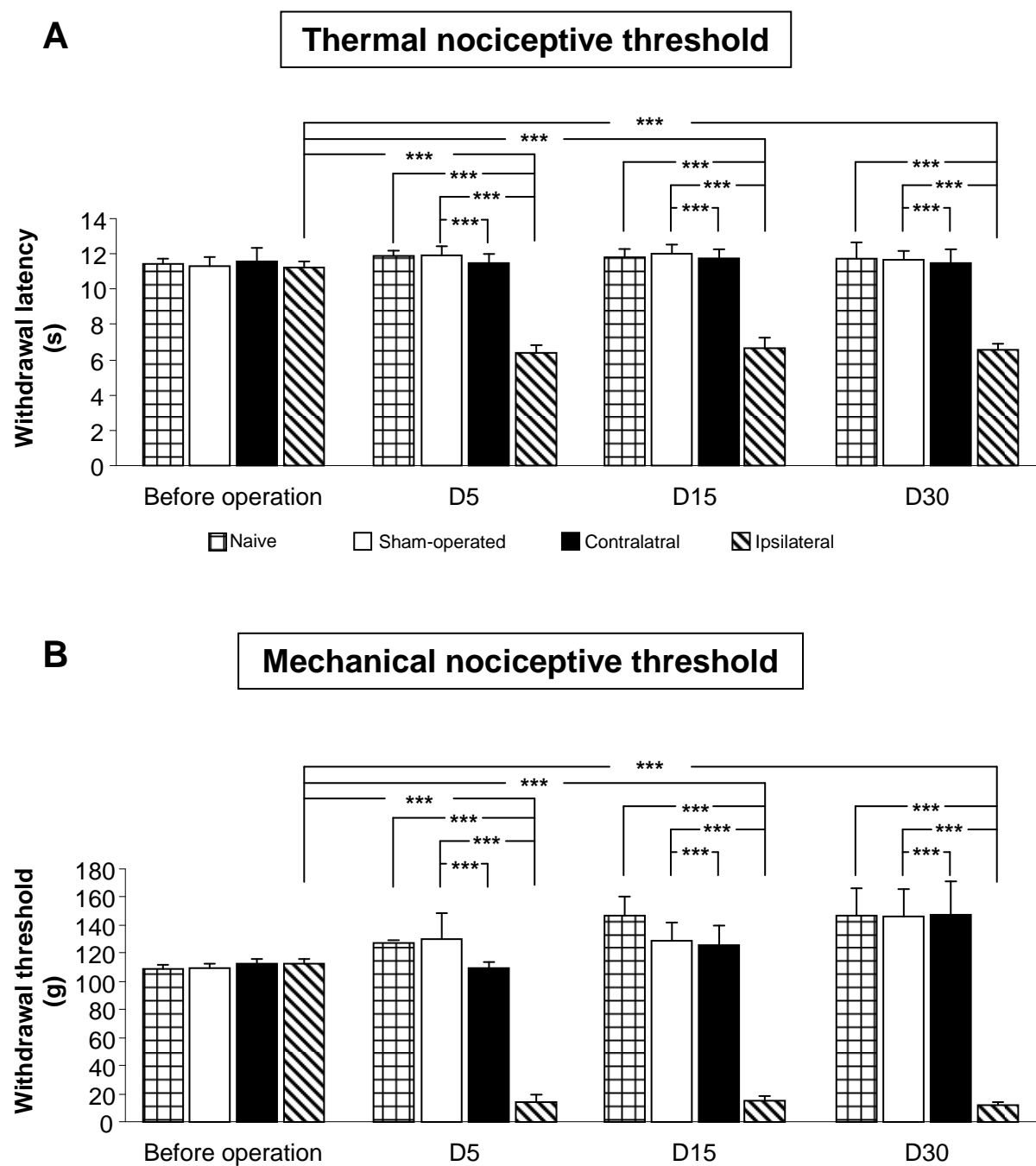
**Fig 1.** Effect of sciatic nerve CCI on thermal (A) and mechanical (B) nociceptive thresholds of the ipsilateral and contralateral paws of neuropathic and of sham-operated rats at days 5 (D5), 15 (D15) and 30 (D30) following the constriction. For the thermal nociceptive thresholds (A) each point represents the mean  $\pm$  SEM of 3 observations on each paw of 5 neuropathic and 5 sham-operated rats. For the mechanical nociceptive thresholds (B) each point represents the mean  $\pm$  SEM of 5 observations on each paw of 5 neuropathic or 5 sham-operated rats. \*\*\* $p < 0.001$ .

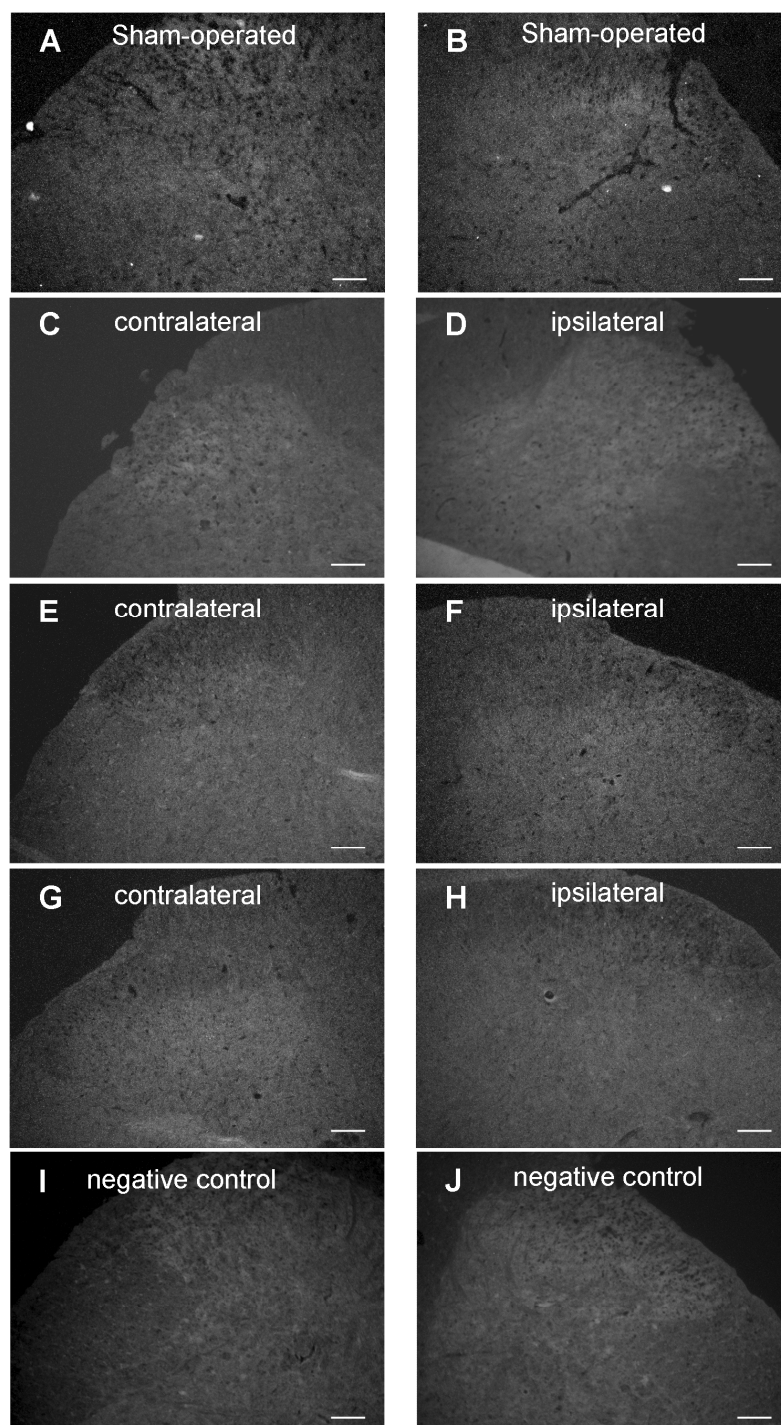
**Fig 2.** Detection of apoptotic cells in spinal cord dorsal horns of sham-operated (A,B) and CCI-rats at days 5 (C,D), 15 (E,F) and 30 (G,H) after the constriction. Negative controls were obtained by omitting terminal deoxynucleotidyl transferase from the incubation medium (I,J). TUNEL was used to detect apoptotic cells in 10  $\mu$ m spinal cord sections. Scale bar: 100  $\mu$ m.

**Fig 3.** Detection of apoptotic cells in the ipsilateral and contralateral dorsal root ganglia of CCI-rats at days 5 (A,B), 15 (C,D) and 30 (E-H) after the sciatic nerve ligation. TUNEL was used to detect apoptotic cells in 10  $\mu$ m sections. TUNEL staining was also performed in DRG of sham-operated rats (I). Negative controls were obtained by omitting terminal deoxynucleotidyl transferase from the incubation medium (J). K, schematic diagram describing the anatomical organization of neurons (N1-N6) and satellite glial cells (SGC) in dorsal root ganglion (Hanani, 2005). Scale bar: 100  $\mu$ m.

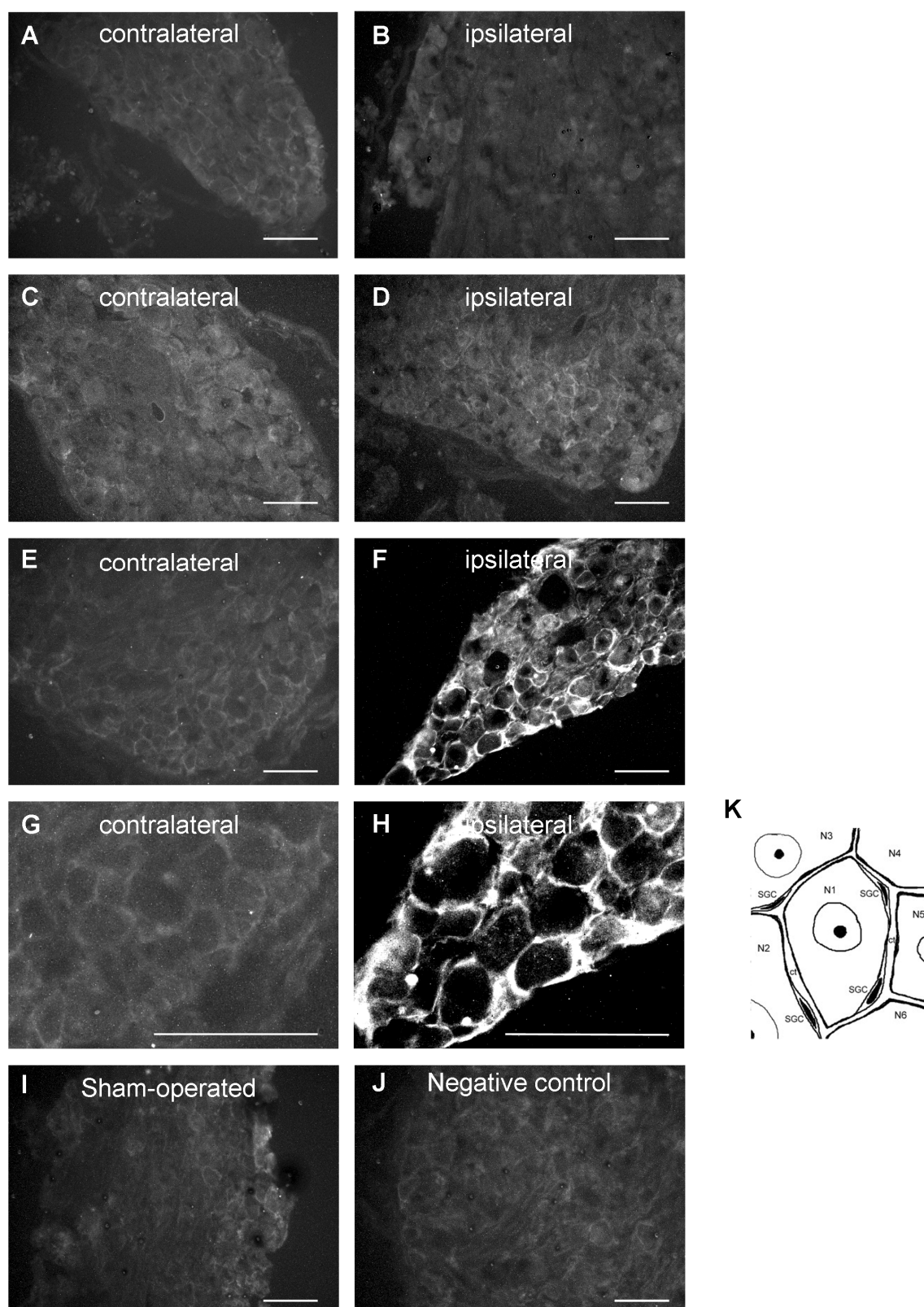
**Fig 4.** HPLC-Flo/One characterization of [ $^3$ H]-neurosteroids produced, after a 3h incorporation of [ $^3$ H]PREG into DRG isolated from naive (A) and sham-operated (B) rats and also from the contralateral (C) and ipsilateral (D) sides of CCI-rats at day 30 following the sciatic nerve ligation. The ordinate indicates the radioactivity measured in the HPLC eluent. The dashed line represents the gradient of secondary solvent (% isopropanol). The arrows indicate elution position of standard steroids. PROG, progesterone; PREG, pregnenolone; T, testosterone; 3 $\alpha$ DIOL, 3 $\alpha$ -androstenediol; 17OHPROG, 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone.

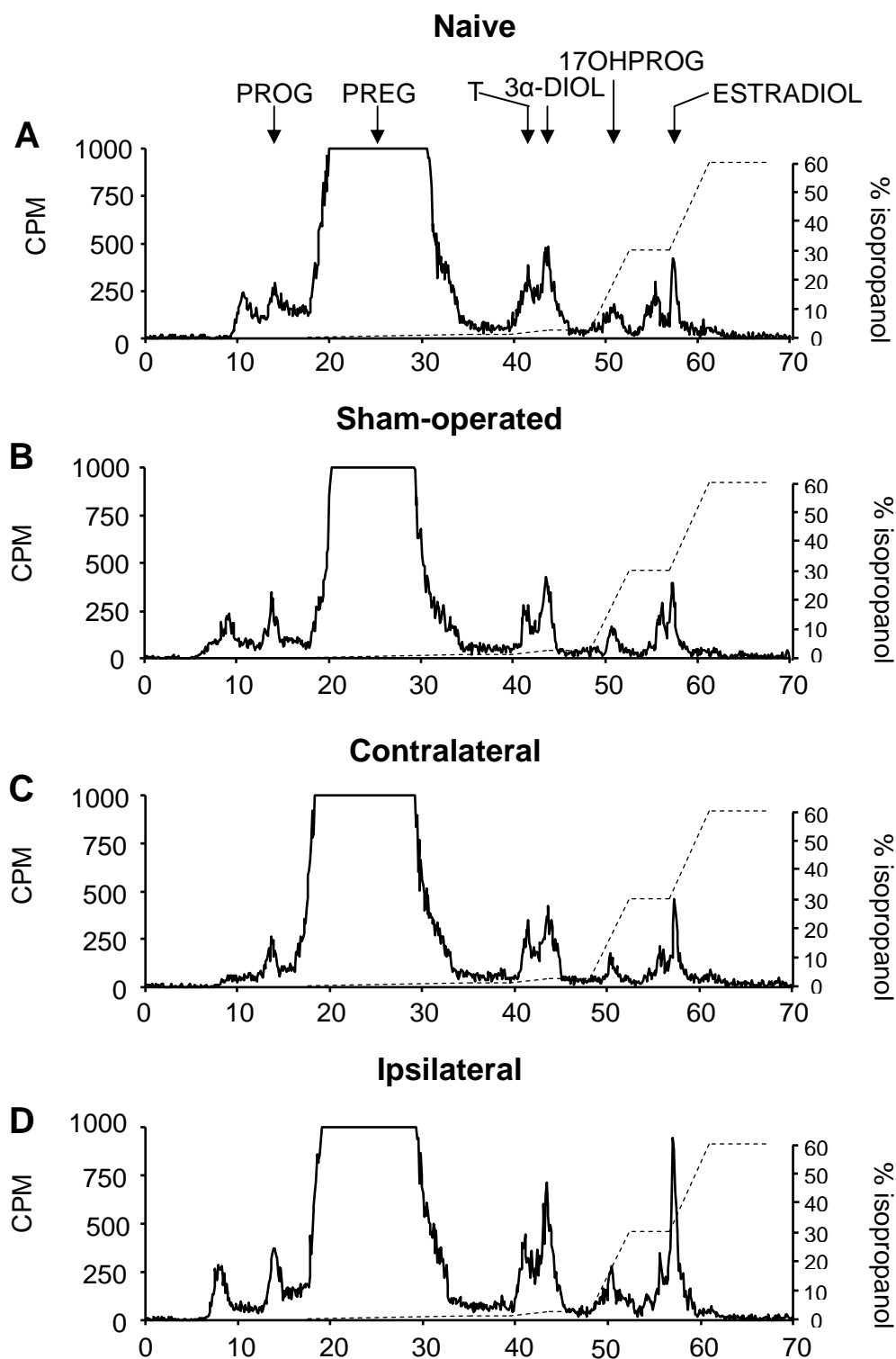
**Fig 5.** Quantitative analysis of the amounts of [ $^3$ H]progesterone (A), [ $^3$ H]17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone (B), [ $^3$ H]testosterone (C), [ $^3$ H]3 $\alpha$ DIOL (D) and [ $^3$ H]estradiol (E) produced, after a 3 h incubation period, from [ $^3$ H]PREG in DRG isolated from the naive, sham-operated and CCI (ipsilateral and contralateral DRG)-rats at day 30 after the sciatic nerve ligation. The values were obtained from experiments similar to that presented in Fig. 4. Each value was calculated as the relative amount of [ $^3$ H]-neurosteroid compared with the total [ $^3$ H]-labeled compounds resolved by HPLC-Flo/One characterization (x100). Each value was then expressed as percentages of the amount of each steroid formed in DRG of naive rats. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01.

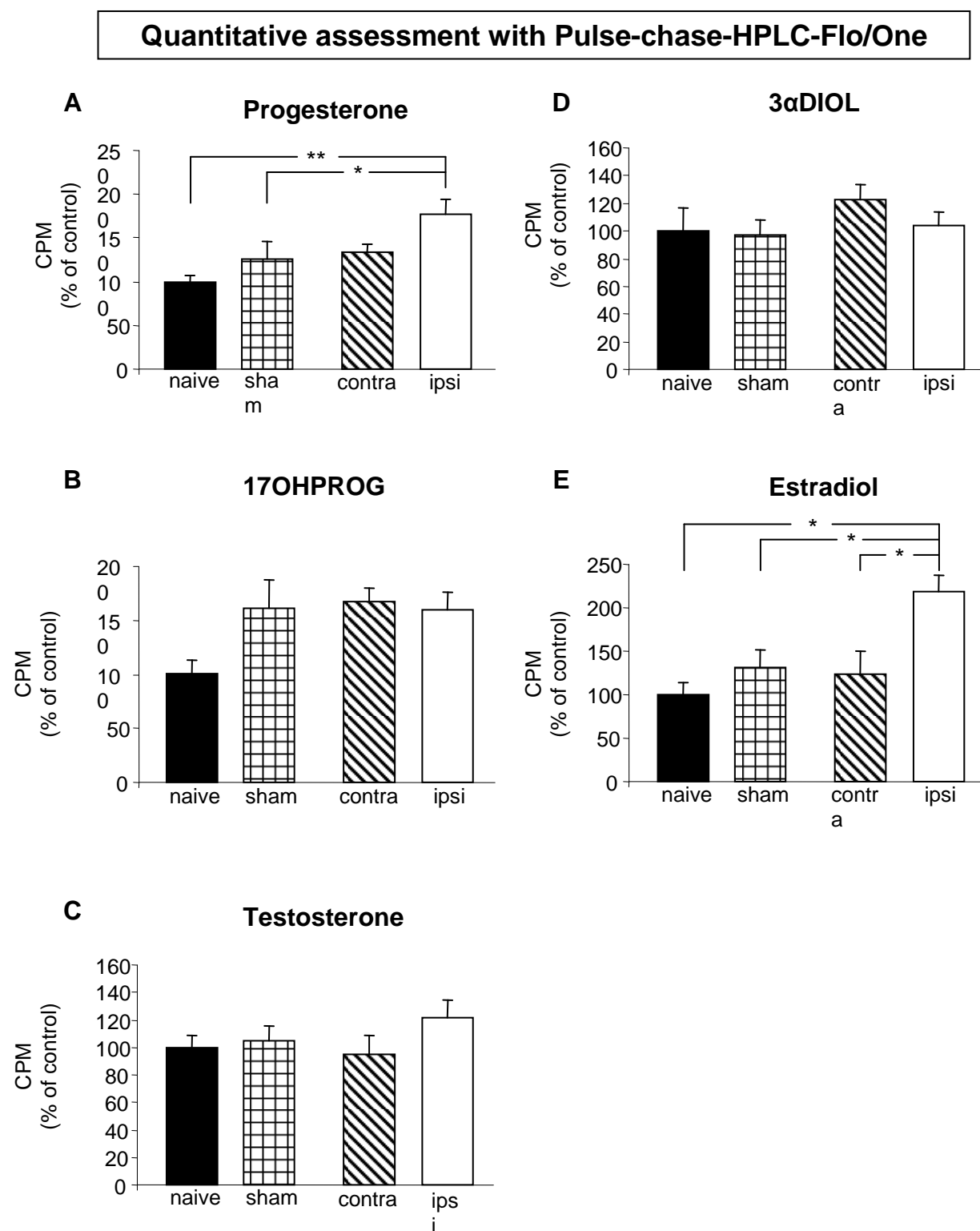
**Figure 1**



**Figure 2**

**Figure 3**

**Qualitative Pulse-chase-HPLC-Flo/One Analysis****Figure 4**



**Figure 5**



## **DISCUSSION**

## **I. Régulation de la neurostéroïdogénèse dans les neuroblastomes humains par des protéines clés de la maladie d'Alzheimer**

Des mesures dans le liquide céphalo-rachidien ou l'évaluation post mortem des concentrations cérébrales de DHEAS et de PREGS chez des patients atteints de maladie d'Alzheimer ont suggéré une corrélation entre la neurostéroïdogénèse et les facteurs étiologiques de la maladie d'Alzheimer (Weill-Engerer et coll. 2002 ; Kim et coll. 2003). Cependant, l'effet des protéines clés impliquées dans la maladie d'Alzheimer sur la production des neurostéroïdes n'a jamais été recherché. De plus, bien que plusieurs études chez l'animal aient indiqué que les neurostéroïdes pourraient participer à la régulation des processus neurodégénératifs (Koenig et coll. 1995 ; Melcangi et coll. 2003 ; Schumacher et coll. 2004), l'implication de la neurostéroïdogénèse dans la protection des cellules nerveuses humaines n'a pas été démontrée. Les résultats présentés dans le premier chapitre (voir résultats pages 107 à 124) montrent que la capacité à produire la progestérone, la  $17\alpha$ -hydroxyprogestérone, la testostérone et la  $3\alpha$ -androstenediol à partir du précurseur prégnénolone est augmentée dans les neuroblastomes humains qui surexpriment la protéine tau normale ou native (Ferrari et coll. 2003). En revanche, la forme mutée P301L de la protéine tau est totalement dépourvue d'effet sur la production des neurostéroïdes dans les cellules SH-SY5Y. La protéine tau native, qui favorise la polymérisation des microtubules, est impliquée dans le transport axonal et contribue à la stabilisation du cytosquelette et à la croissance neuritique en inhibant la dépolymérisation des microtubules (Weingarten et coll. 1975 ; Cleveland et coll. 1977a, b ; Drechsel et coll. 1992 ; Brandt et Lee 1994). L'évènement cellulaire intervenant fréquemment dans de nombreuses pathologies neurodégénératives est la phosphorylation anormale des protéines tau, ce qui conduit à leur agrégation en inclusions filamenteuses intra-neurales (pour revue, Buée et coll. 2000). Des souris transgéniques

surexprimant la protéine tau humaine mutée P301L présentent une accumulation de protéine tau hyperphosphorylée et développent des dégénérescences neurofibrillaires (Lewis et coll. 2000 ; Götz et coll. 2001a, b ; David et coll. 2005). Par ailleurs, plusieurs pathologies neurodégénératives humaines sont associées avec la mutation P301L de la protéine tau qui provoque les dégénérescences neurofibrillaires dans les démences fronto-temporales avec syndrome parkinsonien liées au chromosome 17 (Hutton et coll. 1998a ; Poorkaj et coll. 1998 ; Spillantini et coll. 1998). Ainsi, le fait que l'importante stimulation de la neurostéroïdogénèse induite par la protéine tau native dans les cellules SH-SY5Y n'est pas reproduite par la forme mutée P301L indique que la neurostéroïdogénèse est un mécanisme activé uniquement par la protéine tau native pour stabiliser le cytosquelette et protéger les cellules nerveuses contre la dégénérescence. En accord avec cette hypothèse, des études récentes ont montré que la synthèse du neurostéroïde prégnénolone dans les cellules nerveuses favorise l'assemblage des microtubules en augmentant la polymérisation de la tubuline (Murakami et coll. 2000 ; Plassart-Schiess et Baulieu 2001). Nos travaux ont aussi révélé que l'action stimulatrice de hTau40 est particulièrement importante sur la production de progestérone, qui exerce une action protectrice dans les systèmes nerveux central et périphérique (Koenig et coll. 1995 ; Ghomari et coll. 2003 ; Melcangi et coll. 2003 ; Schumacher et coll. 2004). La surexpression de hTau40 dans les cellules SH-SY5Y augmente également la production de 3 $\alpha$ -androstenediol, un autre neurostéroïde neuroprotecteur (Frye et McCormick 2000 ; Reddy 2004). Par ailleurs, la perte de l'action stimulatrice sur la neurostéroïdogénèse induite par la mutation P301L est parfaitement en accord avec des analyses protéomiques et fonctionnelles récentes démontrant l'existence chez les souris transgéniques P301L d'un dysfonctionnement du système mitochondrial qui joue un rôle crucial dans la biosynthèse des neurostéroïdes (David et coll. 2005).

Les effets de la surexpression de l'APP sur la neurostéroïdogénèse dans les cellules SH-SY5Y varient en fonction du neurostéroïde considéré. En effet, la transfection d'APP, qui inhibe la conversion de prégnénolone en progestérone, n'affecte pas la production de  $17\alpha$ -hydroxyprogestérone et de testostérone mais stimule la biosynthèse de  $3\alpha$ -androstenediol et d'œstradiol. Ces résultats suggèrent que l'APP lui-même et/ou la genèse de concentrations intracellulaires élevées d'A $\beta$  provoquée par la surexpression d'APP (Scheuermann et coll. 2001) exerceraient des effets différents sur la machinerie enzymatique synthétisant les neurostéroïdes. Pour clarifier la situation, nous avons traité les cellules SH-SY5Y transfectées à l'APP par le DAPT, qui inhibe sélectivement la  $\gamma$ -secrétase (une des enzymes clés convertissant l'APP en A $\beta$ ) sans affecter les niveaux d'expression de l'APP (Dovey et coll. 2001 ; Lanz et coll. 2003). En présence de DAPT, la production de progestérone à partir de la prégnénolone est fortement stimulée dans les cellules SH-SY5Y transfectées par l'APP alors que dans les cellules non traitées la synthèse de progestérone est inhibée. Il apparaît donc que, dans les conditions normales (en absence de DAPT), l'APP endogène surexprimé dans les cellules transfectées est converti en peptides dérivés, qui inhibent la synthèse de progestérone. En revanche, quand l'activité enzymatique de la  $\gamma$ -secrétase est bloquée par le DAPT dans les cellules transfectées par l'APP, l'action stimulatrice sur la synthèse de progestérone peut être provoquée par l'APP soluble ( $\alpha$ APP ou  $\beta$ APP) ou par le fragment carboxy-terminal transmembranaire ( $\alpha$ CTF ou  $\beta$ CTF). En effet, il convient de rappeler que l'APP est généralement clivé par l' $\alpha$ -secrétase en  $\alpha$ APP et  $\alpha$ CTF (ou C83) ou par la  $\beta$ -secrétase en  $\beta$ APP et  $\beta$ CTF (ou C99). Ensuite, la  $\gamma$ -secrétase clive les CTF libérant ainsi le p3 et l'A $\beta$  respectivement à partir de l' $\alpha$ CTF et du  $\beta$ CTF (Selkoe 2001 ; Wilquet et De Strooper 2004) (**Figure 12**, page 38). Ainsi, le traitement des cellules SH-SY5Y transfectées par l'APP avec le DAPT empêche la formation d'A $\beta$  dont l'accumulation active les processus neurotoxiques dans la maladie d'Alzheimer (Hensley et coll. 1994 ; Lorenzo et Yankner 1994 ; Mattson

1997 ; Small et McLean 1999). Par conséquent, la diminution de la production de progestérone et l'augmentation de la formation de  $3\alpha$ -androstenediol et d'œstradiol observées dans les cellules SH-SY5Y transfectées par l'APP en absence de DAPT dépend probablement de l'A $\beta$ . Cette hypothèse est soutenue par le fait que l'inhibition de la  $\gamma$ -secrétase induite par le DAPT qui empêche la production intracellulaire d'A $\beta$  permet la détection d'un effet stimulateur de l' $\alpha/\beta$ APP ou de l' $\alpha/\beta$ CTF non seulement sur la progestérone, mais aussi sur la biosynthèse de  $3\alpha,5\alpha$ -THP et de  $17\alpha$ -hydroxyprogestérone. Pour confirmer l'effet potentiel de l'A $\beta$  endogène suggéré par les résultats que nous avons obtenus en absence ou en présence de DAPT, nous avons testé directement les effets d'A $\beta_{25-35}$  exogène sur la production des neurostéroïdes dans les cellules SH-SY5Y. Le peptide synthétique A $\beta_{25-35}$  reproduit exactement l'effet inhibiteur suspecté pour le peptide endogène sur la formation de progestérone mais n'a pas été capable d'augmenter la synthèse de  $3\alpha$ -androstenediol et d'œstradiol. Cette observation suggère que l'effet de l'A $\beta$  ne s'exerce pas de la même façon sur les enzymes responsables de la synthèse de progestérone ( $3\beta$ -hydroxystéroïde déhydrogénase,  $3\beta$ -HSD), de  $3\alpha$ -androstenediol ( $3\alpha$ -hydroxystéroïde oxydoréductase,  $3\alpha$ -HSOR) et d'œstradiol (aromatase). Il est aussi probable que l'action sur la neurostéroïdogénèse du traitement extracellulaire des cellules SH-SY5Y avec l'A $\beta_{25-35}$  synthétique ne soit pas aussi efficace que celle induite par l'A $\beta$  endogène comme c'est le cas pour le contrôle de l'activité mitochondriale et de la production de NO dans les cellules PC12 (Keil et coll. 2004). En particulier, l'efficacité du peptide exogène A $\beta_{25-35}$  semble être restreinte à la première étape de la voie de biosynthèse (conversion de prégnénolone en progestérone) alors que l'A $\beta$  endogène, en s'accumulant dans le compartiment intracellulaire, agirait sur toutes les réactions enzymatiques de sorte à diminuer la production de progestérone avec une augmentation concomitante de la formation de  $3\alpha$ -androstenediol et d'œstradiol. La stimulation de la synthèse d'œstradiol dans les cellules SH-SY5Y transfectées par l'APP en

absence de DAPT pourrait être un mécanisme protecteur activé par ces cellules contre les processus neurotoxiques induits par la formation intracellulaire et/ou l'accumulation d'A $\beta$ . En faveur de cette hypothèse, plusieurs études ont montré des effets neuroprotecteurs du neurostéroïde œstradiol et de l'activité biologique de l'aromatase dans divers modèles expérimentaux (Garcia-Segura et coll. 1999b, 2001, 2003 ; Azcoitia et coll. 2001 ; McCullough et coll. 2003 ; Veiga et coll. 2005).

En conclusion, cette étude démontre que la surexpression de protéines impliquées dans la maladie d'Alzheimer ne modifie pas la morphologie des cellules SH-SY5Y mais change complètement leur activité biochimique responsable de la production des neurostéroïdes. Des études complémentaires seront nécessaires pour clarifier les mécanismes spécifiques utilisés par ces protéines pour contrôler les enzymes de synthèse des neurostéroïdes même s'il est bien démontré que les facteurs étiologiques de la maladie d'Alzheimer (tau et A $\beta$ ) interfèrent avec le système mitochondrial qui détermine l'activité de plusieurs enzymes de synthèse des neurostéroïdes (Baulieu et coll. 1999 ; Mensah-Nyagan et coll. 1999 ; Keil et coll. 2004 ; Payne et Hales 2004 ; David et coll. 2005). La démonstration de l'existence d'un effet de protéines clés impliquées dans les processus neurodégénératifs sur la neurostéroïdogénèse renforce fortement l'hypothèse du contrôle de la neurodégénérescence par les neurostéroïdes dans le système nerveux humain. Le processus de neurostéroïdogénèse apparaît comme un des mécanismes endogènes activé par la protéine tau normale pour contrôler la stabilisation du cytosquelette et protéger les cellules nerveuses contre la neurodégénérescence. La mutation pathogénique de tau ou l'accumulation d'A $\beta$  provoquée par des événements toxiques réduirait la neurostéroïdogénèse, du moins la formation des stéroïdes neuroprotecteurs, pour favoriser les mécanismes dégénératifs. Ainsi, l'identification d'agents pharmacologiques capables de stimuler la production endogène des neurostéroïdes protecteurs

*in vivo* pourrait permettre d'élaborer de nouvelles stratégies pour le traitement des maladies neurodégénératives.

## II. Effets des concentrations physiologiques et toxiques des peptides A $\beta$ <sub>1-42</sub> et A $\beta$ <sub>25-35</sub> sur la neurostéroïdogenèse et la survie des neuroblastomes humains

Il est bien démontré que des concentrations élevées (supérieures à 10  $\mu$ M) d'A $\beta$  sont responsables des plaques amyloïdes dans le cerveau des patients Alzheimer. De nombreux travaux suggèrent aussi que les doses physiologiques ou nanomolaires d'A $\beta$  seraient plutôt neuroprotectrices (Whitson et coll. 1989 ; Koo et coll. 1993 ; Chan et coll. 1999a ; Atwood et coll. 2003). Pour apporter des informations complémentaires sur le rôle des neurostéroïdes dans la neuroprotection, nous avons réalisé une analyse comparative des effets des doses physiologiques/nanomolaires (potentiellement neuroprotectrices) et des fortes concentrations (potentiellement toxiques) des peptides A $\beta$ <sub>1-42</sub> et A $\beta$ <sub>25-35</sub> sur la neurostéroïdogenèse et la survie des cellules SH-SY5Y.

Grâce à la technique de *MTT reduction assay*, nous avons observé que les concentrations nanomolaires d'A $\beta$  n'induisent pas la mort cellulaire des neuroblastomes humains SH-SY5Y alors que de fortes doses (12  $\mu$ M) sont cytotoxiques. En accord avec ces résultats, les concentrations d'A $\beta$  endogène mesurées dans les cellules SH-SY5Y transfectées par l'APP sont dans la gamme de la nanomolaire et aucune toxicité n'est détectée dans ces cellules de même que dans les cellules PC12 surexprimant l'APP (Kögel et coll. 2003 ; Schaeffer et coll. 2006). La combinaison des expériences de pulse-chase à l'analyse HPLC et la détection par scintillation en flux continu (Mensah-Nyagan et coll. 1994, 1996b ; Patten-Mensah et coll. 2003, 2005) nous a permis de constater que, parmi les nombreux neurostéroïdes pouvant être synthétisés à partir de la prégnénolone dans les cellules SH-SY5Y, seuls les taux de progestérone et d'œstradiol néosynthétisés sont affectés par l'A $\beta$ . De façon intéressante, alors que la production de progestérone est inhibée de manière non



sélective par les concentrations physiologiques et toxiques d'A $\beta$ <sub>1-42</sub> et A $\beta$ <sub>25-35</sub>, la formation d'œstradiol est modulée uniquement par le peptide pathogène entier A $\beta$ <sub>1-42</sub>. En effet, les doses nanomolaires/physiologiques d'A $\beta$ <sub>1-42</sub> induisent un effet stimulateur de la synthèse d'œstradiol qui s'inverse en une action inhibitrice à forte concentration d'A $\beta$ <sub>1-42</sub>. L'ensemble de ces résultats révèle l'existence d'un effet sélectif et séquence peptidique dépendant de l'A $\beta$  sur la biosynthèse des neurostéroïdes dans les cellules SH-SY5Y. Notre hypothèse est soutenue par plusieurs études qui montrent que, dans de nombreux modèles expérimentaux, l'A $\beta$ <sub>25-35</sub> induit des effets différents de ceux de l'A $\beta$ <sub>1-42</sub> (Mattson 1997 ; Yao et coll. 2002). Par exemple, il a été démontré que l'A $\beta$ <sub>1-42</sub> peut reproduire les caractéristiques pathologiques de la maladie d'Alzheimer telles que l'activation de la microglie ou la stimulation de l'acétylcholine estérase alors que l'A $\beta$ <sub>25-35</sub> n'en est pas capable (Casal et coll. 2002 ; Sáez-Valero et coll. 2003).

La conversion de [<sup>3</sup>H]prégnénolone en [<sup>3</sup>H]œstradiol requiert les activités complémentaires de diverses enzymes telles que la 3 $\beta$ -hydroxystéroïde déhydrogénase (conversion de la prégnénolone en progestérone), le cytochrome P450c17 (conversion de la progestérone en androstènedione), la 17 $\beta$ -hydroxystéroïde déhydrogénase (conversion de l'androstènedione en testostérone) et l'aromatase (conversion de la testostérone en œstradiol) (**Figure 21**, page 65) (pour revue, Mensah-Nyagan et coll. 1999). Nous n'avons observé aucune différence entre les effets d'A $\beta$ <sub>1-42</sub> et A $\beta$ <sub>25-35</sub> sur la biosynthèse de progestérone à partir de la prégnénolone ce qui indique que les peptides A $\beta$  inhibent l'activité de la 3 $\beta$ -hydroxystéroïde déhydrogénase dans les cellules SH-SY5Y sans spécificité relative à leur séquence d'acides aminés. De même, les effets d'A $\beta$ <sub>1-42</sub> et A $\beta$ <sub>25-35</sub> sur le cytochrome P450c17 et la 17 $\beta$ -hydroxystéroïde déhydrogénase semblent être similaires et indépendants de la séquence peptidique puisqu'aucune différence n'est détectée dans la production de testostérone à partir de la prégnénolone dans les cellules SH-SY5Y exposées à l'A $\beta$ <sub>1-42</sub> ou à

l' $A\beta_{25-35}$ . En revanche, l' $A\beta_{1-42}$  régule de façon dose-dépendante la formation d'œstradiol alors que l' $A\beta_{25-35}$  n'a pas d'effet sur ce mécanisme, suggérant ainsi que la modulation de l'aromatase dépend de la séquence peptidique d' $A\beta$ . En particulier, les données suggèrent que l'activité de l'aromatase peut être contrôlée soit par la séquence N-terminale 1-24 ou soit par la séquence C-terminale 36-42 puisque le fragment 25-35 ( $A\beta_{25-35}$ ) n'a pas d'effet sur la synthèse d'œstradiol alors que la séquence complète 1-42 ( $A\beta_{1-42}$ ) module ce processus. En outre, l'inversion de l'effet stimulateur induit par les doses physiologiques d' $A\beta_{1-42}$  sur la production d'œstradiol en une action inhibitrice lorsque les concentrations d' $A\beta_{1-42}$  deviennent élevées suggère l'existence d'un effet bimodal de l' $A\beta_{1-42}$  sur l'activité de type aromatase. Cet effet bimodal pourrait être déterminant dans la capacité du peptide  $A\beta_{1-42}$  à induire selon sa concentration soit une action protectrice soit un effet dégénératif sur les cellules nerveuses. Ainsi, l'augmentation de la production d'œstradiol évoquée dans les cellules SH-SY5Y par les concentrations physiologiques d' $A\beta_{1-42}$  pourrait les protéger contre la dégénérescence compte tenu du rôle protecteur bien connu des œstrogènes (pour revue, Garcia-Segura et coll. 2001), notamment contre la toxicité liée à l' $A\beta$  (Marin et coll. 2003a, b ; Guerra et coll. 2004). En revanche, la diminution de la formation d'œstradiol provoquée par les doses élevées d' $A\beta_{1-42}$  pourrait contribuer à la dégénérescence et à la mort des cellules SH-SY5Y.

Bien que l'accumulation de dépôts fibrillaires d' $A\beta$  soit considérée comme une étape clé dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer, les interactions avec les membranes cellulaires et les voies de signalisation couplées à la liaison de l' $A\beta$  aux cellules nerveuses ne sont pas bien connues. C'est pourquoi, les cascades intracellulaires conduisant à la modulation de l'activité des enzymes neurostéroïdogéniques dans les cellules SH-SY5Y après leur activation par l' $A\beta$  restent matière à spéculation. Néanmoins, une étude récente, qui s'est intéressée à l'analyse de la fixation d' $A\beta$  aux membranes neuronales, suggère que l' $A\beta$

pourrait tuer les cellules via un récepteur ou une molécule cible membranaire (Hossain et coll. 2007). La caractérisation de ce récepteur ou de cette cible permettra d'étudier les cascades intracellulaires intervenant dans l'action régulatrice exercée par l'A $\beta$  sur les activités des enzymes neurostéroïdiques localisées dans le cytoplasme des cellules SH-SY5Y (Melcangi et coll. 1993 ; Wozniak et coll. 1998 ; Guarneri et coll. 2000). Il ressort tout de même de l'ensemble de nos résultats que le ciblage des voies biochimiques de la neurostéroïdogénèse dans les cellules nerveuses pourrait constituer une piste intéressante à explorer pour le développement de stratégies protectrices contre la toxicité induite par les A $\beta$ .

### **III. Modification de la neurostéroïdogenèse dans les neuroblastomes humains induite par le stress oxydatif**

Le stress oxydatif est bien connu comme étant un processus central impliqué dans de nombreuses pathologies neurodégénératives (Beal 1995 ; Mizuno et coll. 1998 ; Giasson et coll. 2002 ; Andersen 2004). Un des principaux objectifs du projet de thèse (voir pages 76 à 78) était de déterminer si le processus de biosynthèse des neurostéroïdes est un mécanisme cellulaire sélectivement régulé dans les neuroblastomes humains par le stress oxydatif induit par l' $\text{H}_2\text{O}_2$ . Avant d'étudier les effets du  $\text{H}_2\text{O}_2$  sur la neurostéroïdogenèse dans les cellules SH-SY5Y, nous avons réalisé une série de tests de viabilité cellulaire avec diverses doses d' $\text{H}_2\text{O}_2$  et des temps d'incubation différents afin de déterminer les conditions optimales requises pour l'induction d'un stress oxydatif effectif. Les tests ont révélé que la concentration efficace d' $\text{H}_2\text{O}_2$  induisant la mort d'un pourcentage significatif de cellules SH-SY5Y est 1 mM pour des temps d'incubation de 24h ou 48h. Ainsi, pour toutes nos expériences moléculaires, biochimiques et pharmacologiques, nous avons utilisé l' $\text{H}_2\text{O}_2$  à 1 mM et pour les analyses cinétiques nous avons effectué des mesures à différents points temporels (3h, 6h, 12h, 24h et 48h) sur une période totale de 48h. La concentration relativement élevée d' $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mM) requise pour obtenir un pourcentage significatif de mort cellulaire peut s'expliquer par le fait que l' $\text{H}_2\text{O}_2$  est instable et se décompose rapidement. L'index de stabilité de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  est de  $10^{-5}$  secondes (Giorgi et coll. 2007).

Grâce à la combinaison de plusieurs approches, nous avons observé que l'inhibition de la biosynthèse d'œstradiol dans les cellules SH-SY5Y est un mécanisme central par lequel le stress oxydatif induit par l' $\text{H}_2\text{O}_2$  provoque la mort des neuroblastomes humains. En effet, en utilisant la technique de pulse-chase combinée à l'analyse HPLC-Flo/One (Mensah-Nyagan et coll. 1994, 1996a, b ; Patte-Mensah et coll. 2003, 2004a ; Kibaly et coll. 2005 ; Saredi et coll.

2005 ; Schaeffer et coll. 2006) nous avons constaté que l'['<sup>3</sup>H]œstradiol est le seul stéroïde neuroactif dont la production à partir de la [<sup>3</sup>H]prégnénolone diminue fortement dans les cellules SH-SY5Y en condition de stress oxydatif. Le fait que, parmi les nombreuses voies biochimiques de la neurostéroïdogénèse permettant la biosynthèse de plusieurs neurostéroïdes à partir du précurseur [<sup>3</sup>H]prégnénolone (**Figure 21**, page 65), seule la biosynthèse d'['<sup>3</sup>H]œstradiol est significativement affectée dans les cellules SH-SY5Y suggère que l'activité de type aromatase est sélectivement contrôlée par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La formation d'œstradiol endogène décline dans les cellules SH-SY5Y 12h avant l'apparition de la mort cellulaire. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induirait la mort cellulaire en inhibant l'expression et/ou l'activité de l'aromatase dans les cellules SH-SY5Y. Pour vérifier notre hypothèse, nous avons utilisé la technique très sensible de RT-PCR en temps réel pour rechercher la cinétique des effets de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur l'expression du gène codant l'aromatase dans les neuroblastomes. Nous avons observé que le gène codant l'aromatase est réprimé dans les cellules SH-SY5Y stressées avec l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 12h avant l'apparition de la mort cellulaire induite par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cette donnée est parfaitement en accord avec le déclin de la quantité d'['<sup>3</sup>H]œstradiol néosynthétisée 12h après le début du stress oxydatif. A ce temps d'incubation (12h), aucune mort cellulaire n'est détectée et une perte significative des cellules de neuroblastome apparaît à partir de 24h ou 48h, soit au minimum 12h après la diminution de l'expression du gène et de l'activité biologique de l'aromatase. L'ensemble de ces résultats indique que la formation d'œstradiol endogène contribue à la production d'un environnement trophique et protecteur pour les neuroblastomes. Ainsi, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induirait la mort des cellules SH-SY5Y en perturbant l'environnement intracellulaire/extracellulaire protecteur via l'inhibition de l'expression du gène de l'aromatase et de son activité œstrogénique. Cette suggestion a été fortement confirmée par nos expériences ayant étudié les effets d'un traitement à l'œstradiol sur la mort cellulaire induite par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nous avons observé qu'un

prétraitement de 12h des cellules SH-SY5Y avec de l'œstradiol à 100 nM prévient complètement l'apparition de la mort cellulaire causée par l' $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM. En absence d' $\text{H}_2\text{O}_2$ , l'œstradiol n'augmente pas la densité cellulaire des neuroblastomes SH-SY5Y, ce qui suggère que l'œstradiol n'exerce pas d'action proliférative sur les neuroblastomes mais les protège contre la mort via un mécanisme trophique ou anti-apoptotique. En effet, il a été montré que l'œstradiol contrecarre les effets apoptotiques induits par le stress oxydatif via l'activation de la transcription de facteurs anti-apoptotiques tels que Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub> qui contribuent au maintien de l'intégrité de la membrane mitochondriale (Singer et coll. 1998 ; Pike 1999). L'œstradiol est également capable de prévenir la diminution de la production d'ATP induite par l' $\text{H}_2\text{O}_2$  (Wang et coll. 2006). Par ailleurs, nos résultats sur les neuroblastomes humains stressés avec l' $\text{H}_2\text{O}_2$  sont en accord avec les données obtenues sur le tissu cérébral des rongeurs qui montrent une action neuroprotectrice de l'aromatase et de l'œstradiol endogène contre la cytotoxicité provoquée par l'acide kaïnique (Garcia-Segura et coll. 1999b, 2001, 2003 ; Azcoitia et coll. 2001 ; Veiga et coll. 2005). Un travail récent a également démontré que l'inhibition de l'aromatase dans des cellules hippocampiques dissociées diminue la prolifération et augmente l'apoptose des cellules granulaires (Fester et coll. 2006).

En conclusion, nos résultats apportent trois nouvelles informations qui peuvent constituer une avancée significative dans le domaine de recherche sur les neurostéroïdes, en particulier sur l'identification des facteurs neuropathologiques clés interagissant avec la neurostéroïdogenèse. Les données démontrent que :

- (i) La neurostéroïdogenèse est sélectivement modulée dans les neuroblastomes humains par l' $\text{H}_2\text{O}_2$  qui est un facteur clé impliqué dans l'étiologie de diverses neuropathologies
- (ii) L' $\text{H}_2\text{O}_2$  est un inhibiteur de la biosynthèse d'œstradiol dans les cellules SH-SY5Y

- (iii) Le neurostéroïde œstradiol synthétisé de façon endogène dans les cellules SH-SY5Y détermine fortement leur viabilité ou leur survie.

#### **IV. Genèse d'apoptose et modifications de la neurostéroïdogénèse dans les ganglions rachidiens de rats soumis à une douleur neuropathique sciatique**

Les douleurs neuropathiques résultent à la fois de l'excitabilité anormale des neurones sensoriels et des changements pathologiques survenant dans le système nerveux. En particulier, il est bien démontré que les lésions de nerfs conduisent souvent aux douleurs neuropathiques en induisant des modifications biochimiques et fonctionnelles dans les ganglions rachidiens (DRG) et dans la moelle épinière qui jouent un rôle crucial dans la nociception (Bennett et Xie 1988 ; Kingery 1997 ; Koltzenburg 1998 ; Woolf et Mannion 1999 ; Bennett 2003). Un des mécanismes supposés contribuer à la persistance des douleurs neuropathiques chroniques est la mort cellulaire apoptotique survenant dans les DRG et/ou la corne dorsale de la moelle épinière après lésion des afférences primaires (Whiteside et Munglani 2001 ; Zimmermann 2001 ; Maione et coll. 2002 ; Campana et Myers 2003). Or, il existe une importante controverse dans la littérature sur l'implication de l'apoptose dans l'étiologie des douleurs neuropathiques évoquées par les lésions ou constrictions de nerfs. En effet, en utilisant divers modèles expérimentaux de lésions nerveuses, y compris la constriction chronique du nerf sciatique (*chronic constriction injury* ou CCI), plusieurs groupes de recherche ont corrélié l'apparition de mort cellulaire dans les DRG et/ou dans la corne dorsale de la moelle épinière à la chronicité des douleurs neuropathiques (Azkue et coll. 1998 ; Whiteside et Munglani 2001 ; Maione et coll. 2002 ; de Novellis et coll. 2004). Au contraire, d'autres équipes (Polgár et coll. 2003, 2004) ont rapporté une absence de mort cellulaire dans la moelle épinière en utilisant également le modèle de douleur neuropathique induite par CCI du nerf sciatique (Bennett et Xie 1988). Par ailleurs, il a été démontré que la mort neuronale dans la corne dorsale de la moelle épinière n'est pas requise pour le



développement du symptôme d'allodynie tactile dans le modèle de douleur neuropathique induite par lésion périphérique (Polgár et coll. 2005). En conséquence, il était nécessaire de clarifier la situation avant de rechercher les interactions possibles entre la neurostéroïdogénèse et l'apparition de l'apoptose dans les structures nociceptives des rats-CCI ou neuropathiques sciatiques. Nous avons donc utilisé le test de TUNEL pour rechercher la présence de foyers apoptotiques dans les DRG ou la moelle épinière des rats neuropathiques, pseudo-opérés ou naïfs. Nos résultats révèlent une mort cellulaire par apoptose dans une zone restreinte des DRG ipsilatéraux au nerf sciatique comprimé par ligature lâche mais nous n'avons pas détecté d'apoptose dans la moelle épinière. En nous appuyant sur les critères morphologiques d'identification décrits par Hanani (2005), nos résultats suggèrent que les cellules TUNEL-positives détectées dans les DRG correspondent à des cellules gliales satellites (*satellite glial cells* ou SGC). Des expériences de double-marquage avec des marqueurs gliaux et neuronaux (Kennedy 1982 ; Nagle 1988 ; Miller et coll. 2002 ; Weick et coll. 2003) seront toutefois nécessaires pour identifier formellement le type cellulaire apoptotique présent dans les DRG des rats-CCI. Bien que les symptômes de la douleur neuropathique tels que l'hyperalgie thermique et l'allodynie mécanique sont observés chez les rats-CCI à tous les points temporels considérés (D5, D10, D15, D20, D25, D30) sur une période de 30 jours suivant la constriction du nerf sciatique, l'apoptose n'a été observée dans les DRG ipsilatéraux qu'à D30. Il apparaît donc que dans nos conditions expérimentales, la neuropathie sciatique conduit à une genèse d'apoptose dans les DRG ipsilatéraux mais nos résultats suggèrent aussi que la mort cellulaire n'est pas requise pour l'induction des symptômes de douleur neuropathique tels que l'hyperalgie thermique et l'allodynie mécanique. L'apparition de l'apoptose dans les DRG peut toutefois contribuer à l'aggravation des symptômes de la douleur neuropathique.

Pour déterminer si l'apparition des facteurs pro-apoptotiques dans les SGC modifie la capacité neurostéroïdogénique des autres types cellulaires dans les DRG, notamment les neurones sensoriels, nous avons étudié le métabolisme de la [ $^3\text{H}$ ]prégnénolone dans les DRG isolés de la région lombo-sacrée des rats neuropathiques, pseudo-opérés et naïfs. Grâce au couplage pulse-chase-HPLC-Flo/One (Mensah-Nyagan et coll. 1994, 1996b ; Patte-Mensah et coll. 2003, 2004a, 2005 ; Kibaly et coll. 2005, 2007 ; Schaeffer et coll. 2006), nous avons observé que la néosynthèse d' [ $^3\text{H}$ ]œstradiol est significativement augmentée dans les DRG contenant les SGC apoptotiques. Cette observation suggère qu'à travers un mécanisme paracrine ou un dialogue croisé, les facteurs pro-apoptotiques induits dans les SGC par la neuropathie sciatique provoquent dans les neurones sensoriels voisins une stimulation sélective de l'aromatase (enzyme clé de synthèse de l'œstradiol). Une analyse comparative de l'expression du gène codant l'aromatase ou une comparaison de la distribution cellulaire de la protéine de type aromatase dans les DRG des rats-CCI, pseudo-opérés et naïfs permettra sans doute de confirmer la régulation sélective de cette enzyme évoquée par la genèse de l'apoptose. Toutefois, compte tenu de l'effet neuroprotecteur exercé par le neurostéroïde œstradiol dans de nombreux modèles expérimentaux (Garcia-Segura et coll. 1999a, b, 2001, 2003 ; Azcoitia et coll. 2001 ; Marin et coll. 2003a, b ; McCullough et coll. 2003 ; Guerra et coll. 2004 ; Veiga et coll. 2005 ; Fester et coll. 2006), il est possible de spéculer que la stimulation de la synthèse d'œstradiol dans les neurones sensoriels voisins des SGC apoptotiques est un mécanisme régulateur déclenché par ces neurones pour se protéger contre la mort cellulaire. Cette hypothèse est confortée par les travaux montrant que les dysfonctionnements évoqués dans les neurones sensoriels par les lésions périphériques suffisent pour induire les douleurs neuropathiques sans nécessairement provoquer d'apoptose neuronale (Polgár et coll. 2003, 2004, 2005).

Nos résultats indiquent aussi que la synthèse de progestérone est stimulée dans les DRG des rats-CCI comparés aux rats pseudo-opérés. Mais, il n'existe pas de différence significative entre les taux de progestérone néosynthétisés dans les DRG ipsilatéraux comparés aux contralatéraux chez les rat-CCI, ce qui ne facilite pas l'interprétation des données. Il est possible que l'absence de différence significative soit liée au test statistique utilisé. Une augmentation du nombre d'échantillons permettra de vérifier ultérieurement cette idée car la modulation de la synthèse de progestérone pourrait aussi être un indice intéressant compte tenu des propriétés neuroprotectrices de ce neurostéroïde (Koenig et coll. 1995 ; Ghomari et coll. 2003 ; Leonelli et coll. 2007 ; Schumacher et coll. 2007).

En conclusion, ce travail démontre l'existence d'une régulation sélective de la neurostéroïdogénèse dans les DRG suite à l'apoptose induite dans les SGC par une constriction du nerf sciatique qui provoque aussi une douleur neuropathique chronique. Les données suggèrent l'implication des neurostéroïdes endogènes dans le contrôle des processus neurodégénératifs dans les DRG.

## **CONCLUSION GENERALE**

En démarrant ce travail de thèse, notre but (voir descriptif détaillé des objectifs dans l'introduction pages 76 à 78) était de rechercher l'implication des neurostéroïdes dans la régulation des processus neurodégénératifs. Pour ce faire, nous nous sommes intéressés aux interactions de la neurostéroïdogénèse avec les facteurs pro-dégénératifs intervenant dans l'étiologie de la maladie d'Alzheimer et des douleurs neuropathiques en utilisant une approche pluridisciplinaire.

Nos résultats constituent les premières données démontrant que la biosynthèse des neurostéroïdes est sélectivement modulée par des protéines clés impliquées dans la maladie d'Alzheimer. En effet, il apparaît que la surexpression de la protéine tau normale ou native pourrait assurer l'intégrité structurale et fonctionnelle du cytosquelette en stimulant la production endogène de neurostéroïdes neuroprotecteurs. La mutation P301L de la protéine tau entraîne une perte de cette capacité stimulatrice de la neurostéroïdogénèse qui facilite la neurodégénérescence.

Dans une approche comparative, nous avons étudié les effets des peptides  $A\beta_{1-42}$  et  $A\beta_{25-35}$  sur la biosynthèse des neurostéroïdes et la survie en culture des neuroblastomes humains SH-SY5Y. Nos résultats montrent l'existence d'une action sélective et séquence peptidique dépendante de l' $A\beta$  sur la neurostéroïdogénèse dans les cellules SH-SY5Y. En plus, nous avons constaté que les concentrations nanomolaires d' $A\beta_{1-42}$ , qui ne sont pas toxiques pour les neuroblastomes, stimulent la néosynthèse du neurostéroïde protecteur œstradiol. En revanche, les doses élevées d' $A\beta_{1-42}$  ( $\geq 12 \mu M$ ), qui provoquent la mort cellulaire, inhibent la production d'œstradiol endogène dans les cellules SH-SY5Y. Ainsi, nos travaux ont mis en évidence l'existence d'un mécanisme bimodal par lequel l' $A\beta_{1-42}$  pourrait à faible dose stimuler la neurostéroïdogénèse et exercer un effet neuroprotecteur alors qu'à fortes doses l' $A\beta_{1-42}$  inhiberait la biosynthèse des neurostéroïdes pour induire une action délétère.

Nos résultats démontrent également que l'un des mécanismes par lequel l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (un facteur étiologique impliqué dans de nombreuses neuropathologies dégénératives) provoque la mort cellulaire consiste à réprimer le gène codant l'aromatase et son activité œstrogénique. Ainsi, la réduction importante du niveau d'œstradiol endogène dans les cellules SH-SY5Y par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a induit un déséquilibre trophique et environnemental qui a entraîné la mort cellulaire quelques heures plus tard.

Dans le modèle expérimental de douleur neuropathique chronique induite chez le rat par ligature ou constriction du nerf sciatique, nous avons montré qu'il n'y a pas de site apoptotique dans la moelle épinière 30 jours après le début de la neuropathie périphérique. En revanche, nous avons détecté des cellules satellites gliales apoptotiques dans les DRG ipsilatéraux à la constriction nerveuse au 30<sup>ème</sup> jour après l'induction de la neuropathie. L'apparition de l'apoptose dans les cellules satellites a provoqué une stimulation de la biosynthèse d'œstradiol endogène dans les neurones sensoriels voisins, ce qui suggère fortement l'implication de la neurostéroïdogénèse dans la régulation des processus dégénératifs dans les DRG.

L'ensemble de nos résultats montre que les facteurs clés impliqués dans l'étiologie de la maladie d'Alzheimer ou dans l'induction des douleurs neuropathiques modifient significativement et sélectivement les voies de la neurostéroïdogénèse. La production intrinsèque de neurostéroïdes neuroprotecteurs apparaît comme étant indispensable à la survie des cellules nerveuses ou à leur protection contre la dégénérescence car l'inhibition de la biosynthèse de ces neurostéroïdes par les facteurs pro-dégénératifs conduit à la mort cellulaire. Nos travaux ouvrent des perspectives intéressantes pour le développement de stratégies thérapeutiques contre les pathologies neurodégénératives en exploitant directement les neurostéroïdes neuroprotecteurs ou en utilisant des agents pharmacologiques capables de stimuler la production endogène de ces neurostéroïdes dans les cellules nerveuses.

## **PERSPECTIVES**

## **1°) Mécanismes d'action des A $\beta$ sur l'activité de l'aromatase**

Nos résultats suggèrent l'existence d'une action sélective et séquence peptidique dépendante des A $\beta$  sur l'activité de l'aromatase dans les neuroblastomes humains SH-SY5Y. Nous essayerons donc de déterminer les mécanismes par lesquels les A $\beta$  contrôlent l'aromatase. Ainsi, nous étudierons par exemple la possibilité que les A $\beta$  intracellulaires interagissent directement avec l'aromatase dans le cadre des mécanismes de type interactions protéine-protéine. Des expériences de co-immunoprécipitation nous permettront de vérifier si les A $\beta$  se lient directement à l'aromatase pour moduler son activité. Il est également possible que les A $\beta$  induisent des changements de la composition du milieu intracellulaire, ce qui modifierait le pH intracellulaire optimal pour le fonctionnement de l'aromatase. Des mesures du pH intracellulaire par microfluorimétrie en présence et en absence d'A $\beta$  nous permettront de vérifier cette hypothèse. Les A $\beta$  pourraient également se fixer à la membrane plasmique des cellules SH-SY5Y et provoquer une signalisation intracellulaire qui conduirait à la modulation de l'activité de l'aromatase. En effet, plusieurs études ont suggéré que les A $\beta$  pourraient activer les MAP kinases ERK1/2 (Sato et coll. 1997 ; Dineley et coll. 2001 ; Bell et coll. 2004 ; Chong et coll. 2006) qui semblent inhiber l'expression et l'activité de l'aromatase (Singh et coll. 1997 ; Andric et Ascoli 2006 ; McDonald et coll. 2006 ). Ainsi, l'évaluation des concentrations intracellulaires de seconds messagers (AMPc, GMPc ou inositol-triphosphate) et l'étude de l'activité des MAP kinases seront réalisées après exposition des neuroblastomes humains aux A $\beta$ . Ensuite, les effets des messagers intracellulaires dont les concentrations seront significativement affectées par les A $\beta$  seront testés sur l'activité biologique de l'aromatase. Enfin, il est possible que les A $\beta$  modifient l'expression du gène de l'aromatase. Des expériences de RT-PCR en temps réel et de Western blot nous permettront d'évaluer les niveaux de transcrits codant l'aromatase et les concentrations intracellulaires de la protéine de type aromatase dans les neuroblastomes exposés aux A $\beta$ .



## 2°) Effets protecteurs de l'œstradiol sur la cytotoxicité induite par les A $\beta$

Nous avons montré que le prétraitement des neuroblastomes SH-SY5Y avec l'œstradiol permet de les protéger contre le stress oxydatif induit par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De façon similaire, nous réaliserons des prétraitements des cellules SH-SY5Y avec l'œstradiol avant de les exposer aux doses toxiques d'A $\beta$  pour déterminer si l'œstradiol exerce à nouveau un effet neuroprotecteur. Pour s'assurer que l'effet protecteur est véritablement lié à l'œstradiol endogène synthétisée dans les neuroblastomes, nous procèderons à l'inhibition de la synthèse endogène d'œstradiol pour déterminer ensuite l'effet de cette inhibition sur la survie cellulaire. Nous utiliserons deux approches différentes pour réaliser l'inhibition de la production endogène d'œstradiol :

- L'activité de l'aromatase sera inhibée par le letrozole, un agent pharmacologique bien connu pour son efficacité et sa sélectivité d'action sur l'aromatase.
- L'expression de l'aromatase dans les cellules SH-SY5Y sera aussi inactivée par interférence ARN (siRNA).

Après suppression de l'activité œstrogénique de l'aromatase (letrozole) ou de son expression (siRNA) des expériences de *MTT reduction assay* nous permettront de déterminer les conséquences sur la survie des neuroblastomes.

Diverses expériences pharmacologiques seront également réalisées avec des agonistes et antagonistes des récepteurs des œstrogènes pour obtenir des informations sur les mécanismes d'action de l'œstradiol dans la protection contre la mort cellulaire.

### **3°) Effets du neurostéroïde œstradiol sur la croissance neuritique**

La maladie d'Alzheimer est caractérisée par un dysfonctionnement et une désorganisation structurale des synapses liés à la dégénérescence des prolongements neuritiques (Small et coll. 2001 ; Selkoe 2002 ; Oddo et coll. 2003 ; Bell et Cuello 2006). Nous évaluerons donc le rôle de l'œstradiol endogène ou exogène sur la croissance neuritique des neuroblastomes différenciés à l'acide rétinoïque. Les mêmes approches mentionnées dans le paragraphe 2°) ci-dessus (Ietrozole, siRNA, agonistes et antagonistes des récepteurs aux œstrogènes) seront également utilisées pour déterminer le rôle du neurostéroïde endogène (œstradiol) dans la croissance neuritique.

### **4°) Etude *in vivo* de l'action des neurostéroïdes dans la protection contre la neurodégénérescence observée dans la maladie d'Alzheimer**

Pour ce travail, nous envisageons d'utiliser des souris triples transgéniques présentant une mutation de l'APP, de la préséniline et de la protéine tau P301L. Ces souris développent progressivement des dégénérescences neurofibrillaires et des plaques amyloïdes avec un profil spatio-temporel semblable à celui observé dans la pathologie humaine (Oddo et coll. 2003 ; Billings et coll. 2005). Une analyse comparée de la neurostéroïdogenèse dans le cerveau de ces souris transgéniques avec des souris sauvages permettra d'identifier les neurostéroïdes déficients ou synthétisés en excès au cours de la pathologie. Nous testerons ensuite les effets des injections intracérébrales et sous-cutanées de ces neurostéroïdes sur l'étendue des dégénérescences neurofibrillaires, des plaques amyloïdes et sur les capacités mnésiques des animaux.

### **5°) Identification du type cellulaire apoptotique dans les DRG de rats neuropathiques sciatiques**

Nos résultats relatifs au modèle expérimental de douleur neuropathique ont suggéré que 30 jours après constriction du nerf sciatique un foyer apoptotique apparaît dans les DRG mais pas dans la corne dorsale de la moelle épinière. Sur des critères morphologiques, nous pensons que l'apoptose apparaît dans des cellules gliales satellites de la zone medio-latérale des DRG ipsilatéraux au nerf sciatique comprimé. Nous confirmerons la nature du type cellulaire contenant le marquage TUNEL-positif dans les DRG par des expériences de double ou triple immunomarquage qui combineront les tests de TUNEL avec la présence de marqueurs neuronaux (NeuN, neurofilaments) ou gliaux (glutamine synthase, GFAP ou galactocérébroside).

### **6°) Détermination de la nature des cellules qui réagissent à l'apparition d'apoptose par une surproduction d'œstradiol endogène**

Pour l'instant, nos données indiquent que l'augmentation de la néosynthèse d'œstradiol interviendrait dans les neurones sensoriels voisins des cellules satellites gliales apoptotiques. Cette hypothèse sera confirmée par une détermination du niveau d'expression de l'aromatase dans les différents types cellulaires présents dans les DRG des rats neuropathiques, pseudo-opérés et naïfs. L'identification d'une surexpression d'aromatase dans les neurones sensoriels voisins des cellules satellites apoptotiques permettra de confirmer que la surproduction d'œstradiol endogène a effectivement lieu dans ces neurones.

### **7°) Neurostéroïdogenèse dans les DRG avant l'apparition de l'apoptose**

Pour le moment, nous avons étudié la biosynthèse des neurostéroïdes chez les animaux neuropathiques et témoins une fois que nous avons constaté l'apparition du foyer apoptotique (c'est-à-dire à D30). Nous réaliserons la même étude à tous les points temporels précédant D30 à savoir D5, D10, D15, D20 et D25 pour être en mesure de caractériser les éventuels neurostéroïdes dont la biosynthèse est modifiée juste avant l'apparition du foyer apoptotique.

### **8°) Etude *in vivo* et *in vitro* des effets anti-apoptotiques des neurostéroïdes**

L'œstradiol et les neurostéroïdes qui seront caractérisés grâce aux expériences mentionnées ci-dessus (paragraphe 6 et 7) seront utilisés pour des traitements *in vivo* des animaux neuropathiques de façon à vérifier si ces neurostéroïdes sont capables ou non d'empêcher l'apparition du foyer apoptotique dans les DRG. Par ailleurs, sur des DRG isolés de la région lombo-sacrée, nous testerons les effets des neurostéroïdes précités sur l'expression des gènes codant les caspases ou les facteurs pro- ou anti-apoptotiques tels que Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bax, Bak, Bad, Bcl-x<sub>S</sub>, Bid, Bik ou Bim.

### **9°) Etude des effets des neurostéroïdes sur les symptômes de la douleur neuropathique chronique**

Les effets à court et à long termes de l'œstradiol et des autres neurostéroïdes caractérisés (voir paragraphes 6 et 7, pages 247 et 248) seront testés sur les symptômes de la douleur neuropathique chronique induite par la constriction du nerf sciatique. En particulier, nous évaluerons les effets des neurostéroïdes sur l'hyperalgie thermique et l'allodynie

mécanique sur une période d'au moins 30 jours pour établir une relation entre les résultats que nous obtiendrons et ceux dont nous disposons actuellement à D5, D10, D15, D20, D25 et D30.

La maladie d'Alzheimer et les douleurs chroniques neuropathiques constituent des problèmes majeurs de santé publique. Nous espérons qu'à terme, nos travaux permettront d'ouvrir des perspectives intéressantes pouvant contribuer à la mise en place de stratégies efficaces contre ces neuropathologies.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Abraham M. C. et Shaham S. (2004) Death without caspases, caspases without death. *Trends Cell Biol* **14**, 184-193.
- Acehan D., Jiang X., Morgan D. G., Heuser J. E., Wang X. et Akey C. W. (2002) Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* **9**, 423-432.
- Adams J. M. (2003) Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev* **17**, 2481-2495.
- Aksenov M., Aksenova M. V., Harris M. E., Hensley K., Butterfield D. A. et Carney J. M. (1995) Enhancement of beta-amyloid peptide A beta(1-40)-mediated neurotoxicity by glutamine synthetase. *J Neurochem* **65**, 1899-1902.
- Aley K. O., Reichling D. B. et Levine J. D. (1996) Vincristine hyperalgesia in the rat: a model of painful vincristine neuropathy in humans. *Neuroscience* **73**, 259-265.
- Alnemri E. S., Livingston D. J., Nicholson D. W., Salvesen G., Thornberry N. A., Wong W. W. et Yuan J. (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* **87**, 171.
- Alonso A. C., Grundke-Iqbal I. et Iqbal K. (1996) Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nat Med* **2**, 783-787.
- Alonso A. D., Grundke-Iqbal I., Barra H. S. et Iqbal K. (1997) Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 298-303.
- Alvarez A., Toro R., Caceres A. et Maccioni R. B. (1999) Inhibition of tau phosphorylating protein kinase cdk5 prevents beta-amyloid-induced neuronal death. *FEBS Lett* **459**, 421-426.
- Anandatheerthavarada H. K., Biswas G., Robin M. A. et Avadhani N. G. (2003) Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells. *J Cell Biol* **161**, 41-54.
- Andersen J. K. (2004) Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med* **10 Suppl**, S18-25.
- Andric N. et Ascoli M. (2006) A delayed gonadotropin-dependent and growth factor-mediated activation of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 cascade negatively regulates aromatase expression in granulosa cells. *Mol Endocrinol* **20**, 3308-3320.

- Anglade P., Vyas S., Javoy-Agid F., Herrero M. T., Michel P. P., Marquez J., Mouatt-Prigent A., Ruberg M., Hirsch E. C. et Agid Y. (1997) Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol Histopathol* **12**, 25-31.
- Ankarcrona M., Dypbukt J. M., Bonfoco E., Zhivotovsky B., Orrenius S., Lipton S. A. et Nicotera P. (1995) Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* **15**, 961-973.
- Aranda A. et Pascual A. (2001) Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* **81**, 1269-1304.
- Arezzo J. C. et Zotova E. (2002) Electrophysiologic measures of diabetic neuropathy: mechanism and meaning. *Int Rev Neurobiol* **50**, 229-255.
- Arrasate M., Perez M., Valpuesta J. M. et Avila J. (1997) Role of glycosaminoglycans in determining the helicity of paired helical filaments. *Am J Pathol* **151**, 1115-1122.
- Arrasate M., Perez M. et Avila J. (2000) Tau dephosphorylation at tau-1 site correlates with its association to cell membrane. *Neurochem Res* **25**, 43-50.
- Ashkenazi A. et Dixit V. M. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**, 1305-1308.
- Ashkenazi A. et Dixit V. M. (1999) Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 255-260.
- Atwood C. S., Obrenovich M. E., Liu T., Chan H., Perry G., Smith M. A. et Martins R. N. (2003) Amyloid-beta: a chameleon walking in two worlds: a review of the trophic and toxic properties of amyloid-beta. *Brain Res Brain Res Rev* **43**, 1-16.
- Authier N., Coudore F., Eschalier A. et Fialip J. (1999) Pain related behaviour during vincristine-induced neuropathy in rats. *Neuroreport* **10**, 965-968.
- Avila J., Lucas J. J., Perez M. et Hernandez F. (2004) Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev* **84**, 361-384.
- Azcoitia I., Sierra A., Veiga S., Honda S., Harada N. et Garcia-Segura L. M. (2001) Brain aromatase is neuroprotective. *J Neurobiol* **47**, 318-329.
- Azcoitia I., Leonelli E., Magnaghi V., Veiga S., Garcia-Segura L. M. et Melcangi R. C. (2003) Progesterone and its derivatives dihydroprogesterone and tetrahydroprogesterone reduce myelin fiber morphological abnormalities and myelin fiber loss in the sciatic nerve of aged rats. *Neurobiol Aging* **24**, 853-860.
- Azkue J. J., Zimmermann M., Hsieh T. F. et Herdegen T. (1998) Peripheral nerve insult induces NMDA receptor-mediated, delayed degeneration in spinal neurons. *Eur J Neurosci* **10**, 2204-2206.



- Baehrecke E. H. (2005) Autophagy: dual roles in life and death? *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 505-510.
- Bahr B. A. et Bendiske J. (2002) The neuropathogenic contributions of lysosomal dysfunction. *J Neurochem* **83**, 481-489.
- Bannister A. J. et Kouzarides T. (1996) The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* **384**, 641-643.
- Basbaum A. I., Gautron M., Jazat F., Mayes M. et Guilbaud G. (1991) The spectrum of fiber loss in a model of neuropathic pain in the rat: an electron microscopic study. *Pain* **47**, 359-367.
- Baulieu E. E., Robel P. et Schumacher M. (1999) *Contemporary Endocrinology*. Humana Press, Totowa, NJ.
- Beal M. F. (1995) Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann Neurol* **38**, 357-366.
- Beato M., Chavez S. et Truss M. (1996) Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids* **61**, 240-251.
- Beato M. et Klug J. (2000) Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update* **6**, 225-236.
- Beckman J. S., Chen J., Crow J. P. et Ye Y. Z. (1994) Reactions of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite with superoxide dismutase in neurodegeneration. *Prog Brain Res* **103**, 371-380.
- Behl C., Davis J. B., Lesley R. et Schubert D. (1994) Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* **77**, 817-827.
- Belelli D. et Lambert J. J. (2005) Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA(A) receptor. *Nat Rev Neurosci* **6**, 565-575.
- Bell K. A., O'Riordan K. J., Sweatt J. D. et Dineley K. T. (2004) MAPK recruitment by beta-amyloid in organotypic hippocampal slice cultures depends on physical state and exposure time. *J Neurochem* **91**, 349-361.
- Bell K. F. et Cuello A. C. (2006) Altered synaptic function in Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol* **545**, 11-21.
- Bennett G. J. et Xie Y. K. (1988) A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* **33**, 87-107.
- Bennett G. J. (2003) Neuropathic pain: a crisis of definition? *Anesth Analg* **97**, 619-620.
- Benzi G. et Moretti A. (1995) Are reactive oxygen species involved in Alzheimer's disease? *Neurobiol Aging* **16**, 661-674.

- Bergeron R., de Montigny C. et Debonnel G. (1996) Potentiation of neuronal NMDA response induced by dehydroepiandrosterone and its suppression by progesterone: effects mediated via sigma receptors. *J Neurosci* **16**, 1193-1202.
- Bianca V. D., Dusi S., Bianchini E., Dal Pra I. et Rossi F. (1999) beta-amyloid activates the O-2 forming NADPH oxidase in microglia, monocytes, and neutrophils. A possible inflammatory mechanism of neuronal damage in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* **274**, 15493-15499.
- Bicknell G. R. et Cohen G. M. (1995) Cleavage of DNA to large kilobase pair fragments occurs in some forms of necrosis as well as apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **207**, 40-47.
- Bierer L. M., Hof P. R., Purohit D. P., Carlin L., Schmeidler J., Davis K. L. et Perl D. P. (1995) Neocortical neurofibrillary tangles correlate with dementia severity in Alzheimer's disease. *Arch Neurol* **52**, 81-88.
- Billings L. M., Oddo S., Green K. N., McGaugh J. L. et LaFerla F. M. (2005) Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron* **45**, 675-688.
- Blanco J. C., Minucci S., Lu J., Yang X. J., Walker K. K., Chen H., Evans R. M., Nakatani Y. et Ozato K. (1998) The histone acetylase PCAF is a nuclear receptor coactivator. *Genes Dev* **12**, 1638-1651.
- Boje K. M. et Arora P. K. (1992) Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain Res* **587**, 250-256.
- Borchelt D. R., Ratovitski T., van Lare J., Lee M. K., Gonzales V., Jenkins N. A., Copeland N. G., Price D. L. et Sisodia S. S. (1997) Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron* **19**, 939-945.
- Bouhassira D. (1994) [Changes in spinal dorsal horn induced by peripheral nerve involvement]. *Cah Anesthesiol* **42**, 689-697.
- Bouhassira D. (2000) Les douleurs neuropathiques. *Paris. Institut UPSA de la douleur*.
- Brandt R. et Lee G. (1994) Orientation, assembly, and stability of microtubule bundles induced by a fragment of tau protein. *Cell Motil Cytoskeleton* **28**, 143-154.
- Brandt R., Leger J. et Lee G. (1995) Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J Cell Biol* **131**, 1327-1340.

- Buée L., Bussiere T., Buée-Scherrer V., Delacourte A. et Hof P. R. (2000) Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev* **33**, 95-130.
- Buendia B., Santa-Maria A. et Courvalin J. C. (1999) Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis. *J Cell Sci* **112** ( Pt 11), 1743-1753.
- Burkhart C. A., Berman J. W., Swindell C. S. et Horwitz S. B. (1994) Relationship between the structure of taxol and other taxanes on induction of tumor necrosis factor-alpha gene expression and cytotoxicity. *Cancer Res* **54**, 5779-5782.
- Bursch W. (2001) The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ* **8**, 569-581.
- Butterfield D. A., Hensley K., Harris M., Mattson M. et Carney J. (1994) beta-Amyloid peptide free radical fragments initiate synaptosomal lipoperoxidation in a sequence-specific fashion: implications to Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* **200**, 710-715.
- Butterfield D. A., Castegna A., Lauderback C. M. et Drake J. (2002) Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. *Neurobiol Aging* **23**, 655-664.
- Byrd C. A., Bornmann W., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Pavletich N., Rosen N., Nathan C. F. et Ding A. (1999) Heat shock protein 90 mediates macrophage activation by Taxol and bacterial lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5645-5650.
- Caceres A. et Kosik K. S. (1990) Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature* **343**, 461-463.
- Caceres A., Potrebic S. et Kosik K. S. (1991) The effect of tau antisense oligonucleotides on neurite formation of cultured cerebellar macroneurons. *J Neurosci* **11**, 1515-1523.
- Campana W. M. et Myers R. R. (2003) Exogenous erythropoietin protects against dorsal root ganglion apoptosis and pain following peripheral nerve injury. *Eur J Neurosci* **18**, 1497-1506.
- Canevari L., Clark J. B. et Bates T. E. (1999) beta-Amyloid fragment 25-35 selectively decreases complex IV activity in isolated mitochondria. *FEBS Lett* **457**, 131-134.
- Carlson L. E., Sherwin B. B. et Chertkow H. M. (1999) Relationships between dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) and cortisol (CRT) plasma levels and everyday memory in Alzheimer's disease patients compared to healthy controls. *Horm Behav* **35**, 254-263.

- Carreau S., Delalande C., Silandre D., Bourguiba S. et Lambard S. (2006) Aromatase and estrogen receptors in male reproduction. *Mol Cell Endocrinol* **246**, 65-68.
- Casal C., Serratos J. et Tusell J. M. (2002) Relationship between beta-AP peptide aggregation and microglial activation. *Brain Res* **928**, 76-84.
- Casley C. S., Canevari L., Land J. M., Clark J. B. et Sharpe M. A. (2002a) Beta-amyloid inhibits integrated mitochondrial respiration and key enzyme activities. *J Neurochem* **80**, 91-100.
- Casley C. S., Land J. M., Sharpe M. A., Clark J. B., Duchen M. R. et Canevari L. (2002b) Beta-amyloid fragment 25-35 causes mitochondrial dysfunction in primary cortical neurons. *Neurobiol Dis* **10**, 258-267.
- Chan C. W., Dharmarajan A., Atwood C. S., Huang X., Tanzi R. E., Bush A. I. et Martins R. N. (1999a) Anti-apoptotic action of Alzheimer A $\beta$ . *Alzheimer's reports* **2**, 1-6.
- Chan S. L., Griffin W. S. et Mattson M. P. (1999b) Evidence for caspase-mediated cleavage of AMPA receptor subunits in neuronal apoptosis and Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* **57**, 315-323.
- Chan S. L., Furukawa K. et Mattson M. P. (2002) Presenilins and APP in neuritic and synaptic plasticity: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med* **2**, 167-196.
- Chang H. Y., Nishitoh H., Yang X., Ichijo H. et Baltimore D. (1998) Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx. *Science* **281**, 1860-1863.
- Charalampopoulos I., Tsatsanis C., Dermizaki E., Alexaki V. I., Castanas E., Margioris A. N. et Gravanis A. (2004) Dehydroepiandrosterone and allopregnanolone protect sympathoadrenal medulla cells against apoptosis via antiapoptotic Bcl-2 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8209-8214.
- Charalampopoulos I., Alexaki V. I., Lazaridis I., Dermizaki E., Avlonitis N., Tsatsanis C., Calogeropoulou T., Margioris A. N., Castanas E. et Gravanis A. (2006) G protein-associated, specific membrane binding sites mediate the neuroprotective effect of dehydroepiandrosterone. *Faseb J* **20**, 577-579.
- Chen J., Kanai Y., Cowan N. J. et Hirokawa N. (1992) Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature* **360**, 674-677.
- Chen J., Chopp M. et Li Y. (1999) Neuroprotective effects of progesterone after transient middle cerebral artery occlusion in rat. *J Neurol Sci* **171**, 24-30.

- Chicheportiche Y., Bourdon P. R., Xu H., Hsu Y. M., Scott H., Hession C., Garcia I. et Browning J. L. (1997) TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem* **272**, 32401-32410.
- Chong Y. H., Shin Y. J., Lee E. O., Kaye R., Glabe C. G. et Tenner A. J. (2006) ERK1/2 activation mediates Abeta oligomer-induced neurotoxicity via caspase-3 activation and tau cleavage in rat organotypic hippocampal slice cultures. *J Biol Chem* **281**, 20315-20325.
- Cizkova D., Lukacova N., Marsala M. et Marsala J. (2002) Neuropathic pain is associated with alterations of nitric oxide synthase immunoreactivity and catalytic activity in dorsal root ganglia and spinal dorsal horn. *Brain Res Bull* **58**, 161-171.
- Clarke P. G. (1990) Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl)* **181**, 195-213.
- Cleveland D. W., Hwo S. Y. et Kirschner M. W. (1977a) Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J Mol Biol* **116**, 227-247.
- Cleveland D. W., Hwo S. Y. et Kirschner M. W. (1977b) Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol Biol* **116**, 207-225.
- Colton C. A. et Gilbert D. L. (1987) Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the microglia. *FEBS Lett* **223**, 284-288.
- Compagnone N. A. et Mellon S. H. (2000) Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Front Neuroendocrinol* **21**, 1-56.
- Corpéchet C., Robel P., Axelson M., Sjoval J. et Baulieu E. E. (1981) Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 4704-4707.
- Corpéchet C., Synguelakis M., Talha S., Axelson M., Sjoval J., Vihko R., Baulieu E. E. et Robel P. (1983) Pregnenolone and its sulfate ester in the rat brain. *Brain Res* **270**, 119-125.
- Cotman C. W. (1998) Apoptosis decision cascades and neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **19**, S29-32.
- Courteix C., Eschalier A. et Lavarenne J. (1993) Streptozocin-induced diabetic rats: behavioural evidence for a model of chronic pain. *Pain* **53**, 81-88.
- Cutler S. M., VanLandingham J. W., Murphy A. Z. et Stein D. G. (2006) Slow-release and injected progesterone treatments enhance acute recovery after traumatic brain injury. *Pharmacol Biochem Behav* **84**, 420-428.

- David D. C., Hauptmann S., Scherping I., Schuessel K., Keil U., Rizzu P., Ravid R., Drose S., Brandt U., Müller W. E., et coll. (2005) Proteomic and functional analyses reveal a mitochondrial dysfunction in P301L tau transgenic mice. *J Biol Chem* **280**, 23802-23814.
- Davidson R. M., Shajenko L. et Donta T. S. (1994) Amyloid beta-peptide (A beta P) potentiates a nimodipine-sensitive L-type barium conductance in N1E-115 neuroblastoma cells. *Brain Res* **643**, 324-327.
- Davis B. M., Mohs R. C., Greenwald B. S., Mathe A. A., Johns C. A., Horvath T. B. et Davis K. L. (1985) Clinical studies of the cholinergic deficit in Alzheimer's disease. I. Neurochemical and neuroendocrine studies. *J Am Geriatr Soc* **33**, 741-748.
- De Brabander M., Geuens G., Nuydens R., Willebrords R. et De Mey J. (1981) Taxol induces the assembly of free microtubules in living cells and blocks the organizing capacity of the centrosomes and kinetochores. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 5608-5612.
- de Novellis V., Siniscalco D., Galderisi U., Fuccio C., Nolano M., Santoro L., Cascino A., Roth K. A., Rossi F. et Maione S. (2004) Blockade of glutamate mGlu5 receptors in a rat model of neuropathic pain prevents early over-expression of pro-apoptotic genes and morphological changes in dorsal horn lamina II. *Neuropharmacology* **46**, 468-479.
- De Roo M., Rodeau J. L. et Schlichter R. (2003) Dehydroepiandrosterone potentiates native ionotropic ATP receptors containing the P2X2 subunit in rat sensory neurones. *J Physiol* **552**, 59-71.
- Debonnel G., Bergeron R. et de Montigny C. (1996) Potentiation by dehydroepiandrosterone of the neuronal response to N-methyl-D-aspartate in the CA3 region of the rat dorsal hippocampus: an effect mediated via sigma receptors. *J Endocrinol* **150 Suppl**, S33-42.
- Decosterd I. et Woolf C. J. (2000) Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* **87**, 149-158.
- Delacourte A., Sergeant N., Wattez A., Gauvreau D. et Robitaille Y. (1998) Vulnerable neuronal subsets in Alzheimer's and Pick's disease are distinguished by their tau isoform distribution and phosphorylation. *Ann Neurol* **43**, 193-204.
- Delacourte A., David J. P., Sergeant N., Buée L., Wattez A., Vermersch P., Ghozali F., Fallet-Bianco C., Pasquier F., Lebert F., et coll. (1999) The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology* **52**, 1158-1165.
- Desarnaud F., Do Thi A. N., Brown A. M., Lemke G., Suter U., Baulieu E. E. et Schumacher M. (1998) Progesterone stimulates the activity of the promoters of peripheral myelin protein-22 and protein zero genes in Schwann cells. *J Neurochem* **71**, 1765-1768.

- Deveraux Q. L., Takahashi R., Salvesen G. S. et Reed J. C. (1997) X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* **388**, 300-304.
- Deveraux Q. L. et Reed J. C. (1999) IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* **13**, 239-252.
- Dexter D. T., Carter C. J., Wells F. R., Javoy-Agid F., Agid Y., Lees A., Jenner P. et Marsden C. D. (1989) Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *J Neurochem* **52**, 381-389.
- di Michele F., Lekieffre D., Pasini A., Bernardi G., Benavides J. et Romeo E. (2000) Increased neurosteroids synthesis after brain and spinal cord injury in rats. *Neurosci Lett* **284**, 65-68.
- Dineley K. T., Westerman M., Bui D., Bell K., Ashe K. H. et Sweatt J. D. (2001) Beta-amyloid activates the mitogen-activated protein kinase cascade via hippocampal alpha7 nicotinic acetylcholine receptors: In vitro and in vivo mechanisms related to Alzheimer's disease. *J Neurosci* **21**, 4125-4133.
- Ding A. H., Porteu F., Sanchez E. et Nathan C. F. (1990) Shared actions of endotoxin and taxol on TNF receptors and TNF release. *Science* **248**, 370-372.
- Ding D., Moskowitz S. I., Li R., Lee S. B., Esteban M., Tomaselli K., Chan J. et Bergold P. J. (2000) Acidosis induces necrosis and apoptosis of cultured hippocampal neurons. *Exp Neurol* **162**, 1-12.
- Djebaili M., Guo Q., Pettus E. H., Hoffman S. W. et Stein D. G. (2005) The neurosteroids progesterone and allopregnanolone reduce cell death, gliosis, and functional deficits after traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* **22**, 106-118.
- Dong Z., Saikumar P., Weinberg J. M. et Venkatachalam M. A. (1997) Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement of serine but not cysteine proteases. *Am J Pathol* **151**, 1205-1213.
- Dovey H. F., John V., Anderson J. P., Chen L. Z., de Saint Andrieu P., Fang L. Y., Freedman S. B., Folmer B., Goldbach E., Holsztynska E. J., et coll. (2001) Functional gamma-secretase inhibitors reduce beta-amyloid peptide levels in brain. *J Neurochem* **76**, 173-181.
- Drechsel D. N., Hyman A. A., Cobb M. H. et Kirschner M. W. (1992) Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol Biol Cell* **3**, 1141-1154.
- Du C., Fang M., Li Y., Li L. et Wang X. (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**, 33-42.

- Earnshaw W. C., Martins L. M. et Kaufmann S. H. (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* **68**, 383-424.
- Eaton M. J., Plunkett J. A., Karmally S., Martinez M. A. et Montanez K. (1998) Changes in GAD- and GABA- immunoreactivity in the spinal dorsal horn after peripheral nerve injury and promotion of recovery by lumbar transplant of immortalized serotonergic precursors. *J Chem Neuroanat* **16**, 57-72.
- Ebneth A., Godemann R., Stamer K., Illenberger S., Trinczek B. et Mandelkow E. (1998) Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease. *J Cell Biol* **143**, 777-794.
- Eckert A., Steiner B., Marques C., Leutz S., Romig H., Haass C. et Müller W. E. (2001) Elevated vulnerability to oxidative stress-induced cell death and activation of caspase-3 by the Swedish amyloid precursor protein mutation. *J Neurosci Res* **64**, 183-192.
- Eckert A., Keil U., Marques C. A., Bonert A., Frey C., Schussel K. et Müller W. E. (2003) Mitochondrial dysfunction, apoptotic cell death, and Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol* **66**, 1627-1634.
- Edbauer D., Winkler E., Regula J. T., Pesold B., Steiner H. et Haass C. (2003) Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat Cell Biol* **5**, 486-488.
- Enari M., Sakahira H., Yokoyama H., Okawa K., Iwamatsu A. et Nagata S. (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **391**, 43-50.
- Fath T., Eidenmuller J. et Brandt R. (2002) Tau-mediated cytotoxicity in a pseudohyperphosphorylation model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* **22**, 9733-9741.
- Feinstein S. C. et Wilson L. (2005) Inability of tau to properly regulate neuronal microtubule dynamics: a loss-of-function mechanism by which tau might mediate neuronal cell death. *Biochim Biophys Acta* **1739**, 268-279.
- Ferrari A., Hoerndli F., Baechi T., Nitsch R. M. et Götz J. (2003) beta-Amyloid induces paired helical filament-like tau filaments in tissue culture. *J Biol Chem* **278**, 40162-40168.
- Ferri K. F. et Kroemer G. (2000) Control of apoptotic DNA degradation. *Nat Cell Biol* **2**, E63-64.
- Fesik S. W. et Shi Y. (2001) Structural biology. Controlling the caspases. *Science* **294**, 1477-1478.



- Fester L., Ribeiro-Gouveia V., Prange-Kiel J., von Schassen C., Bottner M., Jarry H. et Rune G. M. (2006) Proliferation and apoptosis of hippocampal granule cells require local oestrogen synthesis. *J Neurochem* **97**, 1136-1144.
- Fitzpatrick J. L., Mize A. L., Wade C. B., Harris J. A., Shapiro R. A. et Dorsa D. M. (2002) Estrogen-mediated neuroprotection against beta-amyloid toxicity requires expression of estrogen receptor alpha or beta and activation of the MAPK pathway. *J Neurochem* **82**, 674-682.
- Fonte C., Grenier J., Trousson A., Chauchereau A., Lahuna O., Baulieu E. E., Schumacher M. et Massaad C. (2005) Involvement of {beta}-catenin and unusual behavior of CBP and p300 in glucocorticosteroid signaling in Schwann cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 14260-14265.
- Fox A., Eastwood C., Gentry C., Manning D. et Urban L. (1999) Critical evaluation of the streptozotocin model of painful diabetic neuropathy in the rat. *Pain* **81**, 307-316.
- Friedlander R. M., Brown R. H., Gagliardini V., Wang J. et Yuan J. (1997) Inhibition of ICE slows ALS in mice. *Nature* **388**, 31.
- Frye C. A. et McCormick C. M. (2000) The neurosteroid, 3alpha-androstanediol, prevents inhibitory avoidance deficits and pyknotic cells in the granule layer of the dentate gyrus induced by adrenalectomy in rats. *Brain Res* **855**, 166-170.
- Garcia-Estrada J., Luquin S., Fernandez A. M. et Garcia-Segura L. M. (1999) Dehydroepiandrosterone, pregnenolone and sex steroids down-regulate reactive astroglia in the male rat brain after a penetrating brain injury. *Int J Dev Neurosci* **17**, 145-151.
- Garcia-Segura L. M., Cardona-Gomez P., Naftolin F. et Chowen J. A. (1998) Estradiol upregulates Bcl-2 expression in adult brain neurons. *Neuroreport* **9**, 593-597.
- Garcia-Segura L. M., Naftolin F., Hutchison J. B., Azcoitia I. et Chowen J. A. (1999a) Role of astroglia in estrogen regulation of synaptic plasticity and brain repair. *J Neurobiol* **40**, 574-584.
- Garcia-Segura L. M., Wozniak A., Azcoitia I., Rodriguez J. R., Hutchison R. E. et Hutchison J. B. (1999b) Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair. *Neuroscience* **89**, 567-578.
- Garcia-Segura L. M., Azcoitia I. et DonCarlos L. L. (2001) Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol* **63**, 29-60.
- Garcia-Segura L. M., Veiga S., Sierra A., Melcangi R. C. et Azcoitia I. (2003) Aromatase: a neuroprotective enzyme. *Prog Neurobiol* **71**, 31-41.

- Gautron M., Jazat F., Ratinahirana H., Hauw J. J. et Guilbaud G. (1990) Alterations in myelinated fibres in the sciatic nerve of rats after constriction: possible relationships between the presence of abnormal small myelinated fibres and pain-related behaviour. *Neurosci Lett* **111**, 28-33.
- Gazelius B., Cui J. G., Svensson M., Meyerson B. et Linderöth B. (1996) Photochemically induced ischaemic lesion of the rat sciatic nerve. A novel method providing high incidence of mononeuropathy. *Neuroreport* **7**, 2619-2623.
- Ghoumari A. M., Dusart I., El-Etr M., Tronche F., Sotelo C., Schumacher M. et Baulieu E. E. (2003) Mifepristone (RU486) protects Purkinje cells from cell death in organotypic slice cultures of postnatal rat and mouse cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 7953-7958.
- Giasson B. I., Ischiropoulos H., Lee V. M. et Trojanowski J. Q. (2002) The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Free Radic Biol Med* **32**, 1264-1275.
- Giorgi M., Trinei M., Migliaccio E. et Pelicci P.G. (2007) Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **8**, 722-728.
- Glennner G. G. et Wong C. W. (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* **120**, 885-890.
- Goedert M., Wischik C. M., Crowther R. A., Walker J. E. et Klug A. (1988) Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 4051-4055.
- Goedert M., Spillantini M. G., Jakes R., Rutherford D. et Crowther R. A. (1989a) Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* **3**, 519-526.
- Goedert M., Spillantini M. G., Potier M. C., Ulrich J. et Crowther R. A. (1989b) Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *Embo J* **8**, 393-399.
- Goedert M. et Jakes R. (1990) Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *Embo J* **9**, 4225-4230.
- Goedert M. et Jakes R. (2005) Mutations causing neurodegenerative tauopathies. *Biochim Biophys Acta* **1739**, 240-250.

- Goedert M. et Spillantini M. G. (2006) A century of Alzheimer's disease. *Science* **314**, 777-781.
- Gonzalez Deniselle M. C., Lopez-Costa J. J., Saavedra J. P., Pietranera L., Gonzalez S. L., Garay L., Guennoun R., Schumacher M. et De Nicola A. F. (2002) Progesterone neuroprotection in the Wobbler mouse, a genetic model of spinal cord motor neuron disease. *Neurobiol Dis* **11**, 457-468.
- Good P. F., Hsu A., Werner P., Perl D. P. et Olanow C. W. (1998) Protein nitration in Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **57**, 338-342.
- Götz J., Chen F., Barmettler R. et Nitsch R. M. (2001a) Tau filament formation in transgenic mice expressing P301L tau. *J Biol Chem* **276**, 529-534.
- Götz J., Chen F., van Dorpe J. et Nitsch R. M. (2001b) Formation of neurofibrillary tangles in P301L tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. *Science* **293**, 1491-1495.
- Green D. R. et Reed J. C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**, 1309-1312.
- Green D. R. (2005) Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell* **121**, 671-674.
- Grelik C., Bennett G. J. et Ribeiro-da-Silva A. (2005) Autonomic fibre sprouting and changes in nociceptive sensory innervation in the rat lower lip skin following chronic constriction injury. *Eur J Neurosci* **21**, 2475-2487.
- Griffin L. D., Gong W., Verot L. et Mellon S. H. (2004) Niemann-Pick type C disease involves disrupted neurosteroidogenesis and responds to allopregnanolone. *Nat Med* **10**, 704-711.
- Gross A., McDonnell J. M. et Korsmeyer S. J. (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* **13**, 1899-1911.
- Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Quinlan M., Tung Y. C., Zaidi M. S. et Wisniewski H. M. (1986a) Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* **261**, 6084-6089.
- Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Tung Y. C., Quinlan M., Wisniewski H. M. et Binder L. I. (1986b) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 4913-4917.
- Guarneri P., Cascio C., Piccoli T., Piccoli F. et Guarneri R. (2000) Human neuroblastoma SH-SY5Y cell line: neurosteroid-producing cell line relying on cytoskeletal organization. *J Neurosci Res* **60**, 656-665.
- Guerra B., Diaz M., Alonso R. et Marin R. (2004) Plasma membrane oestrogen receptor mediates neuroprotection against beta-amyloid toxicity through activation of Raf-1/MEK/ERK cascade in septal-derived cholinergic SN56 cells. *J Neurochem* **91**, 99-109.

- Guilbaud G., Gautron M., Jazat F., Ratinahirana H., Hassig R. et Hauw J. J. (1993) Time course of degeneration and regeneration of myelinated nerve fibres following chronic loose ligatures of the rat sciatic nerve: can nerve lesions be linked to the abnormal pain-related behaviours? *Pain* **53**, 147-158.
- Gupta S. (2003) Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis (Review). *Int J Oncol* **22**, 15-20.
- Gureje O. (2007) Psychiatric aspects of pain. *Curr Opin Psychiatry* **20**, 42-46.
- Guth L., Zhang Z. et Roberts E. (1994) Key role for pregnenolone in combination therapy that promotes recovery after spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12308-12312.
- Haass C. (2004) Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *Embo J* **23**, 483-488.
- Hanahan D. et Weinberg R. A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.
- Hanani M. (2005) Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. *Brain Res Brain Res Rev* **48**, 457-476.
- Hao J. X., Blakeman K. H., Yu W., Hultenby K., Xu X. J. et Wiesenfeld-Hallin Z. (2000) Development of a mouse model of neuropathic pain following photochemically induced ischemia in the sciatic nerve. *Exp Neurol* **163**, 231-238.
- Harada J. et Sugimoto M. (1999) Activation of caspase-3 in beta-amyloid-induced apoptosis of cultured rat cortical neurons. *Brain Res* **842**, 311-323.
- Harding T. M., Morano K. A., Scott S. V. et Klionsky D. J. (1995) Isolation and characterization of yeast mutants in the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway. *J Cell Biol* **131**, 591-602.
- Hardy J. A. et Higgins G. A. (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* **256**, 184-185.
- Hargreaves K., Dubner R., Brown F., Flores C. et Joris J. (1988) A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* **32**, 77-88.
- Hengartner M. O. (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**, 770-776.
- Hensley K., Carney J. M., Mattson M. P., Aksenova M., Harris M., Wu J. F., Floyd R. A. et Butterfield D. A. (1994) A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 3270-3274.
- Hensley K., Hall N., Subramaniam R., Cole P., Harris M., Aksenov M., Aksenova M., Gabbita S. P., Wu J. F., Carney J. M., et coll. (1995) Brain regional correspondence

- between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. *J Neurochem* **65**, 2146-2156.
- Hensley K., Maidt M. L., Yu Z., Sang H., Markesbery W. R. et Floyd R. A. (1998) Electrochemical analysis of protein nitrotyrosine and dityrosine in the Alzheimer brain indicates region-specific accumulation. *J Neurosci* **18**, 8126-8132.
- Hickman J. A. (2002) Apoptosis and tumourigenesis. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 67-72.
- Hillen T., Lun A., Reischies F. M., Borchelt M., Steinhagen-Thiessen E. et Schaub R. T. (2000) DHEA-S plasma levels and incidence of Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* **47**, 161-163.
- Himes R. H., Kersey R. N., Heller-Bettinger I. et Samson F. E. (1976) Action of the vinca alkaloids vincristine, vinblastine, and desacetyl vinblastine amide on microtubules in vitro. *Cancer Res* **36**, 3798-3802.
- Hirai K., Aliev G., Nunomura A., Fujioka H., Russell R. L., Atwood C. S., Johnson A. B., Kress Y., Vinters H. V., Tabaton M., et coll. (2001) Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J Neurosci* **21**, 3017-3023.
- Hirokawa N., Shiomura Y. et Okabe S. (1988) Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules. *J Cell Biol* **107**, 1449-1459.
- Hogan Q. (2002) Animal pain models. *Reg Anesth Pain Med* **27**, 385-401.
- Hossain S., Grande M., Ahmadkhanov G. et Pramanik A. (2007) Binding of the Alzheimer amyloid beta-peptide to neuronal cell membranes by fluorescence correlation spectroscopy. *Exp Mol Pathol* **82**, 169-174.
- Hoyk Z., Parducz A. et Garcia-Segura L. M. (2004) Dehydroepiandrosterone regulates astroglia reaction to denervation of olfactory glomeruli. *Glia* **48**, 207-216.
- Hu Y., Benedict M. A., Ding L. et Nunez G. (1999) Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *Embo J* **18**, 3586-3595.
- Hulsebosch C. E., Xu G. Y., Perez-Polo J. R., Westlund K. N., Taylor C. P. et McAdoo D. J. (2000) Rodent model of chronic central pain after spinal cord contusion injury and effects of gabapentin. *J Neurotrauma* **17**, 1205-1217.
- Hutton M., Lendon C. L., Rizzu P., Baker M., Froelich S., Houlden H., Pickering-Brown S., Chakraverty S., Isaacs A., Grover A., et coll. (1998a) Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* **393**, 702-705.
- Hutton M., Perez-Tur J. et Hardy J. (1998b) Genetics of Alzheimer's disease. *Essays Biochem* **33**, 117-131.

- Ibuki T., Hama A. T., Wang X. T., Pappas G. D. et Sagen J. (1997) Loss of GABA-immunoreactivity in the spinal dorsal horn of rats with peripheral nerve injury and promotion of recovery by adrenal medullary grafts. *Neuroscience* **76**, 845-858.
- Iqbal K., Zaidi T., Bancher C. et Grundke-Iqbal I. (1994) Alzheimer paired helical filaments. Restoration of the biological activity by dephosphorylation. *FEBS Lett* **349**, 104-108.
- Iqbal K., Alonso Adel C., Chen S., Chohan M. O., El-Akkad E., Gong C. X., Khatoon S., Li B., Liu F., Rahman A., et coll. (2005) Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta* **1739**, 198-210.
- Ishunina T. A., van Beurden D., van der Meulen G., Unmehopa U. A., Hol E. M., Huitinga I. and Swaab D. F. (2005) Diminished aromatase immunoreactivity in the hypothalamus, but not in the basal forebrain nuclei in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **26**, 173-194.
- Ja'afer F. M., Hamdan F. B. et Mohammed F. H. (2006) Vincristine-induced neuropathy in rat: electrophysiological and histological study. *Exp Brain Res* **173**, 334-345.
- Jämsä A., Hasslund K., Cowburn R. F., Backstrom A. et Vasange M. (2004) The retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor differentiated SH-SY5Y cell line as a model for Alzheimer's disease-like tau phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* **319**, 993-1000.
- Jiang N., Chopp M., Stein D. et Feit H. (1996) Progesterone is neuroprotective after transient middle cerebral artery occlusion in male rats. *Brain Res* **735**, 101-107.
- Jirmanova I. (1993) Giant axonopathy in streptozotocin diabetes of rats. *Acta Neuropathol (Berl)* **86**, 42-48.
- Joachim C. L., Duffy L. K., Morris J. H. et Selkoe D. J. (1988) Protein chemical and immunocytochemical studies of meningovascular beta-amyloid protein in Alzheimer's disease and normal aging. *Brain Res* **474**, 100-111.
- Johnstone R. W., Ruefli A. A. et Lowe S. W. (2002) Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* **108**, 153-164.
- Jordan J., Galindo M. F. et Miller R. J. (1997) Role of calpain- and interleukin-1 beta converting enzyme-like proteases in the beta-amyloid-induced death of rat hippocampal neurons in culture. *J Neurochem* **68**, 1612-1621.
- Joseph E. K. et Levine J. D. (2004) Caspase signalling in neuropathic and inflammatory pain in the rat. *Eur J Neurosci* **20**, 2896-2902.
- Julius D. et Basbaum A. I. (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature* **413**, 203-210.

- Jung S. S., Nalbantoglu J. et Cashman N. R. (1996) Alzheimer's beta-amyloid precursor protein is expressed on the surface of immediately ex vivo brain cells: a flow cytometric study. *J Neurosci Res* **46**, 336-348.
- Jung-Testas I., Do Thi A., Koenig H., Desarnaud F., Shazand K., Schumacher M. et Baulieu E. E. (1999) Progesterone as a neurosteroid: synthesis and actions in rat glial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* **69**, 97-107.
- Kaneto H., Fujii J., Seo H. G., Suzuki K., Matsuoka T., Nakamura M., Tatsumi H., Yamasaki Y., Kamada T. et Taniguchi N. (1995) Apoptotic cell death triggered by nitric oxide in pancreatic beta-cells. *Diabetes* **44**, 733-738.
- Kang J., Lemaire H. G., Unterbeck A., Salbaum J. M., Masters C. L., Grzeschik K. H., Multhaup G., Beyreuther K. et Muller-Hill B. (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* **325**, 733-736.
- Kawashima R., Kojima H., Nakamura K., Arahata A., Fujita Y., Tokuyama Y., Saito T., Furudate S., Kurihara T., Yagishita S., et coll. (2007) Alterations in mRNA expression of myelin proteins in the sciatic nerves and brains of streptozotocin-induced diabetic rats. *Neurochem Res* **32**, 1002-1010.
- Keil U., Bonert A., Marques C. A., Scherping I., Weyermann J., Strosznajder J. B., Muller-Spahn F., Haass C., Czech C., Pradier L., et coll. (2004) Amyloid beta-induced changes in nitric oxide production and mitochondrial activity lead to apoptosis. *J Biol Chem* **279**, 50310-50320.
- Kennedy P. G. (1982) Neural cell markers and their applications to neurology. *J Neuroimmunol* **2**, 35-53.
- Kerr J. F., Wyllie A. H. et Currie A. R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239-257.
- Kibaly C., Patte-Mensah C. et Mensah-Nyagan A. G. (2005) Molecular and neurochemical evidence for the biosynthesis of dehydroepiandrosterone in the adult rat spinal cord. *J Neurochem* **93**, 1220-1230.
- Kibaly C., Meyer L., Patte-Mensah C. et Mensah-Nyagan A. G. (2007) Biochemical and functional evidence for the control of pain mechanisms by dehydroepiandrosterone endogenously synthesized in the spinal cord. *Faseb J* doi: 10.1096/fj.07-8930com.
- Kim H., Bang O. Y., Jung M. W., Ha S. D., Hong H. S., Huh K., Kim S. U. et Mook-Jung I. (2001) Neuroprotective effects of estrogen against beta-amyloid toxicity are mediated by estrogen receptors in cultured neuronal cells. *Neurosci Lett* **302**, 58-62.

- Kim H. K., Park S. K., Zhou J. L., Taglialatela G., Chung K., Coggeshall R. E. et Chung J. M. (2004) Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. *Pain* **111**, 116-124.
- Kim S. B., Hill M., Kwak Y. T., Hampl R., Jo D. H. et Morfin R. (2003) Neurosteroids: Cerebrospinal fluid levels for Alzheimer's disease and vascular dementia diagnostics. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 5199-5206.
- Kim S. H. et Chung J. M. (1992) An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* **50**, 355-363.
- Kimberly W. T., LaVoie M. J., Ostaszewski B. L., Ye W., Wolfe M. S. et Selkoe D. J. (2003) Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6382-6387.
- Kimonides V. G., Khatibi N. H., Svendsen C. N., Sofroniew M. V. et Herbert J. (1998) Dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA-sulfate (DHEAS) protect hippocampal neurons against excitatory amino acid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 1852-1857.
- Kingery W. S. (1997) A critical review of controlled clinical trials for peripheral neuropathic pain and complex regional pain syndromes. *Pain* **73**, 123-139.
- Kisen G. O., Tessitore L., Costelli P., Gordon P. B., Schwarze P. E., Baccino F. M. et Seglen P. O. (1993) Reduced autophagic activity in primary rat hepatocellular carcinoma and ascites hepatoma cells. *Carcinogenesis* **14**, 2501-2505.
- Klein K. et Henk W. (1963) [Clinical experimental studies on the influence of aldosterone on hemodynamics and blood coagulation.]. *Z Kreislaufforsch* **52**, 40-53.
- Klionsky D. J. et Emr S. D. (2000) Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* **290**, 1717-1721.
- Kluck R. M., Bossy-Wetzel E., Green D. R. et Newmeyer D. D. (1997) The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* **275**, 1132-1136.
- Koenig H. L., Schumacher M., Ferzaz B., Thi A. N., Ressouches A., Guennoun R., Jung-Testas I., Robel P., Akwa Y. et Baulieu E. E. (1995) Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann cells. *Science* **268**, 1500-1503.
- Kögel D., Schomburg R., Schürmann T., Reimertz C., König H. G., Poppe M., Eckert A., Müller W. E. et Prehn J. H. (2003) The amyloid precursor protein protects PC12 cells against endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Neurochem* **87**, 248-256.
- Kohler D. R. et Goldspiel B. R. (1994) Paclitaxel (taxol). *Pharmacotherapy* **14**, 3-34.



- Koltzenburg M. (1998) Painful neuropathies. *Curr Opin Neurol* **11**, 515-521.
- Koo E. H., Park L. et Selkoe D. J. (1993) Amyloid beta-protein as a substrate interacts with extracellular matrix to promote neurite outgrowth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 4748-4752.
- Kosik K. S., Joachim C. L. et Selkoe D. J. (1986) Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 4044-4048.
- Kosik K. S. (1992) Alzheimer's disease: a cell biological perspective. *Science* **256**, 780-783.
- Kothakota S., Azuma T., Reinhard C., Klippel A., Tang J., Chu K., McGarry T. J., Kirschner M. W., Kohts K., Kwiatkowski D. J., et coll. (1997) Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* **278**, 294-298.
- Kouzmenko A. P., Takeyama K., Ito S., Furutani T., Sawatsubashi S., Maki A., Suzuki E., Kawasaki Y., Akiyama T., Tabata T., et coll. (2004) Wnt/beta-catenin and estrogen signaling converge in vivo. *J Biol Chem* **279**, 40255-40258.
- Krammer P. H. (2000) CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* **407**, 789-795.
- Kupers R., Yu W., Persson J. K., Xu X. J. et Wiesenfeld-Hallin Z. (1998) Photochemically-induced ischemia of the rat sciatic nerve produces a dose-dependent and highly reproducible mechanical, heat and cold allodynia, and signs of spontaneous pain. *Pain* **76**, 45-59.
- Kuwana T. et Newmeyer D. D. (2003) Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 691-699.
- Labombarda F., Pianos A., Liere P., Eychenne B., Gonzalez S., Cambourg A., De Nicola A. F., Schumacher M. et Guennoun R. (2006) Injury elicited increase in spinal cord neurosteroid content analyzed by gas chromatography mass spectrometry. *Endocrinology* **147**, 1847-1859.
- LaFerla F. M., Tinkle B. T., Bieberich C. J., Haudenschield C. C. et Jay G. (1995) The Alzheimer's A beta peptide induces neurodegeneration and apoptotic cell death in transgenic mice. *Nat Genet* **9**, 21-30.
- Lambard S. et Carreau S. (2005) Aromatase and oestrogens in human male germ cells. *Int J Androl* **28**, 254-259.
- Lang P. M., Schober G. M., Rolke R., Wagner S., Hilge R., Offenbacher M., Treede R. D., Hoffmann U. et Irnich D. (2006) Sensory neuropathy and signs of central sensitization in patients with peripheral arterial disease. *Pain* **124**, 190-200.
- Lantéri-Minet M. (2001) Aspects étiologiques des douleurs neuropathiques d'origine périphérique. Dans Les douleurs neuropathiques, *Institut UPSA de la douleur*, Paris. p 13-38.

- Lanz T. A., Himes C. S., Pallante G., Adams L., Yamazaki S., Amore B. et Merchant K. M. (2003) The gamma-secretase inhibitor N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester reduces A beta levels in vivo in plasma and cerebrospinal fluid in young (plaque-free) and aged (plaque-bearing) Tg2576 mice. *J Pharmacol Exp Ther* **305**, 864-871.
- Lapchak P. A., Chapman D. F., Nunez S. Y. et Zivin J. A. (2000) Dehydroepiandrosterone sulfate is neuroprotective in a reversible spinal cord ischemia model: possible involvement of GABA(A) receptors. *Stroke* **31**, 1953-1956; discussion 1957.
- Le W. D., Colom L. V., Xie W. J., Smith R. G., Alexianu M. et Appel S. H. (1995) Cell death induced by beta-amyloid 1-40 in MES 23.5 hybrid clone: the role of nitric oxide and NMDA-gated channel activation leading to apoptosis. *Brain Res* **686**, 49-60.
- LeBlanc A., Liu H., Goodyer C., Bergeron C. et Hammond J. (1999) Caspase-6 role in apoptosis of human neurons, amyloidogenesis, and Alzheimer's disease. *J Biol Chem* **274**, 23426-23436.
- Leblhuber F., Neubauer C., Peichl M., Reisecker F., Steinparz F. X., Windhager E. et Dienstl E. (1993) Age and sex differences of dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) and cortisol (CRT) plasma levels in normal controls and Alzheimer's disease (AD). *Psychopharmacology (Berl)* **111**, 23-26.
- Lee C. Y. et Baehrecke E. H. (2001) Steroid regulation of autophagic programmed cell death during development. *Development* **128**, 1443-1455.
- Legrain S., Berr C., Frenoy N., Gourlet V., Debuire B. et Baulieu E. E. (1995) Dehydroepiandrosterone sulfate in a long-term care aged population. *Gerontology* **41**, 343-351.
- Leist M., Single B., Castoldi A. F., Kuhnle S. et Nicotera P. (1997) Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* **185**, 1481-1486.
- Leist M. et Jäättelä M. (2001) Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 589-598.
- Leonelli E., Bianchi R., Cavaletti G., Caruso D., Crippa D., Garcia-Segura L. M., Lauria G., Magnaghi V., Roglio I. et Melcangi R. C. (2007) Progesterone and its derivatives are neuroprotective agents in experimental diabetic neuropathy: a multimodal analysis. *Neuroscience* **144**, 1293-1304.
- Lewis J., McGowan E., Rockwood J., Melrose H., Nacharaju P., Van Slegtenhorst M., Gwinn-Hardy K., Paul Murphy M., Baker M., Yu X., et coll. (2000) Neurofibrillary tangles,

- amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nat Genet* **25**, 402-405.
- Li H., Zhu H., Xu C. J. et Yuan J. (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**, 491-501.
- Li H., Klein G., Sun P. et Buchan A. M. (2001a) Dehydroepiandrosterone (DHEA) reduces neuronal injury in a rat model of global cerebral ischemia. *Brain Res* **888**, 263-266.
- Li L. Y., Luo X. et Wang X. (2001b) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **412**, 95-99.
- Li Y. P., Bushnell A. F., Lee C. M., Perlmutter L. S. et Wong S. K. (1996) Beta-amyloid induces apoptosis in human-derived neurotypic SH-SY5Y cells. *Brain Res* **738**, 196-204.
- Liang X. H., Jackson S., Seaman M., Brown K., Kempkes B., Hibshoosh H. et Levine B. (1999) Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* **402**, 672-676.
- Liston P., Fong W. G. et Korneluk R. G. (2003) The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. *Oncogene* **22**, 8568-8580.
- Liu D. et Dillon J. S. (2002) Dehydroepiandrosterone activates endothelial cell nitric-oxide synthase by a specific plasma membrane receptor coupled to Galpha(i2,3). *J Biol Chem* **277**, 21379-21388.
- Liu D. et Dillon J. S. (2004) Dehydroepiandrosterone stimulates nitric oxide release in vascular endothelial cells: evidence for a cell surface receptor. *Steroids* **69**, 279-289.
- Liu X., Zou H., Slaughter C. et Wang X. (1997) DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* **89**, 175-184.
- Lober S., Vulevic B. et Correia J. J. (1996) Interaction of vinca alkaloids with tubulin: a comparison of vinblastine, vincristine, and vinorelbine. *Biochemistry* **35**, 6806-6814.
- Longthorne V. L. et Williams G. T. (1997) Caspase activity is required for commitment to Fas-mediated apoptosis. *Embo J* **16**, 3805-3812.
- Lorenzo A. et Yankner B. A. (1994) Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12243-12247.
- Lorenzo H. K., Susin S. A., Penninger J. et Kroemer G. (1999) Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ* **6**, 516-524.
- Lovell M. A., Ehmann W. D., Mattson M. P. et Markesbery W. R. (1997) Elevated 4-hydroxynonenal in ventricular fluid in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **18**, 457-461.

- Lovell M. A., Gabbita S. P. et Markesbery W. R. (1999) Increased DNA oxidation and decreased levels of repair products in Alzheimer's disease ventricular CSF. *J Neurochem* **72**, 771-776.
- Lucas J. J., Hernandez F., Gomez-Ramos P., Moran M. A., Hen R. et Avila J. (2001) Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *Embo J* **20**, 27-39.
- Lum J. J., Bauer D. E., Kong M., Harris M. H., Li C., Lindsten T. et Thompson C. B. (2005) Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* **120**, 237-248.
- Luo X., Budihardjo I., Zou H., Slaughter C. et Wang X. (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94**, 481-490.
- Mailliot C., Bussiere T., Caillet-Boudin M. L., Delacourte A. et Buée L. (1998) Alzheimer-specific epitope of AT100 in transfected cell lines with tau: toward an efficient cell model of tau abnormal phosphorylation. *Neurosci Lett* **255**, 13-16.
- Maione S., Siniscalco D., Galderisi U., de Novellis V., Uliano R., Di Bernardo G., Berrino L., Cascino A. et Rossi F. (2002) Apoptotic genes expression in the lumbar dorsal horn in a model neuropathic pain in rat. *Neuroreport* **13**, 101-106.
- Majewska M. D. (1992) Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABAA receptor. Mechanism of action and physiological significance. *Prog Neurobiol* **38**, 379-395.
- Manzano A., Roig T., Bermudez J. et Bartrons R. (1996) Effects of taxol on isolated rat hepatocyte metabolism. *Am J Physiol* **271**, C1957-1962.
- Mao X. et Barger S. W. (1998) Neuroprotection by dehydroepiandrosterone-sulfate: role of an NFkappaB-like factor. *Neuroreport* **9**, 759-763.
- Marin R., Guerra B., Hernandez-Jimenez J. G., Kang X. L., Fraser J. D., Lopez F. J. et Alonso R. (2003a) Estradiol prevents amyloid-beta peptide-induced cell death in a cholinergic cell line via modulation of a classical estrogen receptor. *Neuroscience* **121**, 917-926.
- Marin R., Guerra B., Morales A., Diaz M. et Alonso R. (2003b) An oestrogen membrane receptor participates in estradiol actions for the prevention of amyloid-beta peptide1-40-induced toxicity in septal-derived cholinergic SN56 cells. *J Neurochem* **85**, 1180-1189.
- Marin R., Ramirez C. M., Gonzalez M., Alonso R. et Diaz M. (2006) Alternative estrogen receptors homologous to classical receptor alpha in murine neural tissues. *Neurosci Lett* **395**, 7-11.

- Markesbery W. R. et Lovell M. A. (1998) Four-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, is increased in the brain in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **19**, 33-36.
- Marques C. A., Keil U., Bonert A., Steiner B., Haass C., Müller W. E. et Eckert A. (2003) Neurotoxic mechanisms caused by the Alzheimer's disease-linked Swedish amyloid precursor protein mutation: oxidative stress, caspases, and the JNK pathway. *J Biol Chem* **278**, 28294-28302.
- Marsters S. A., Sheridan J. P., Pitti R. M., Brush J., Goddard A. et Ashkenazi A. (1998) Identification of a ligand for the death-domain-containing receptor Apo3. *Curr Biol* **8**, 525-528.
- Martin L. J., Al-Abdulla N. A., Brambrink A. M., Kirsch J. R., Sieber F. E. et Portera-Cailliau C. (1998) Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res Bull* **46**, 281-309.
- Martin L. J. (2001) Neuronal cell death in nervous system development, disease, and injury (Review). *Int J Mol Med* **7**, 455-478.
- Martini L., Magnaghi V. et Melcangi R. C. (2003) Actions of progesterone and its 5alpha-reduced metabolites on the major proteins of the myelin of the peripheral nervous system. *Steroids* **68**, 825-829.
- Masters C. L., Simms G., Weinman N. A., Multhaup G., McDonald B. L. et Beyreuther K. (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 4245-4249.
- Matsuzaki H., Tamatani M., Mitsuda N., Namikawa K., Kiyama H., Miyake S. et Tohyama M. (1999) Activation of Akt kinase inhibits apoptosis and changes in Bcl-2 and Bax expression induced by nitric oxide in primary hippocampal neurons. *J Neurochem* **73**, 2037-2046.
- Mattson M. P. (1997) Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev* **77**, 1081-1132.
- Mattson M. P. (2000) Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 120-129.
- Mattson M. P. et Liu D. (2002) Energetics and oxidative stress in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders. *Neuromolecular Med* **2**, 215-231.
- Mattson M. P. (2004) Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* **430**, 631-639.

- McCullough L. D., Blizzard K., Simpson E. R., Oz O. K. et Hurn P. D. (2003) Aromatase cytochrome P450 and extragonadal estrogen play a role in ischemic neuroprotection. *J Neurosci* **23**, 8701-8705.
- McDonald C. A., Millena A. C., Reddy S., Finlay S., Vizcarra J., Khan S. A. et Davis J. S. (2006) Follicle-stimulating hormone-induced aromatase in immature rat Sertoli cells requires an active phosphatidylinositol 3-kinase pathway and is inhibited via the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Mol Endocrinol* **20**, 608-618.
- McGeer P. L. et McGeer E. G. (2002) Local neuroinflammation and the progression of Alzheimer's disease. *J Neurovirol* **8**, 529-538.
- Meda L., Cassatella M. A., Szendrei G. I., Otvos L., Jr., Baron P., Villalba M., Ferrari D. et Rossi F. (1995) Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. *Nature* **374**, 647-650.
- Medori R., Jenich H., Autilio-Gambetti L. et Gambetti P. (1988) Experimental diabetic neuropathy: similar changes of slow axonal transport and axonal size in different animal models. *J Neurosci* **8**, 1814-1821.
- Meffre D., Delespierre B., Gouezou M., Schumacher M., Stein D. G. et Guennoun R. (2007) 3beta-Hydroxysteroid dehydrogenase/5-ene-4-ene isomerase mRNA expression in rat brain: Effect of pseudopregnancy and traumatic brain injury. *J Steroid Biochem Mol Biol*.
- Melcangi R. C., Maggi R. et Martini L. (1993) Testosterone and progesterone metabolism in the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *J Steroid Biochem Mol Biol* **46**, 811-818.
- Melcangi R. C., Magnaghi V., Cavarretta I., Martini L. et Piva F. (1998) Age-induced decrease of glycoprotein Po and myelin basic protein gene expression in the rat sciatic nerve. Repair by steroid derivatives. *Neuroscience* **85**, 569-578.
- Melcangi R. C., Magnaghi V. et Martini L. (2000) Aging in peripheral nerves: regulation of myelin protein genes by steroid hormones. *Prog Neurobiol* **60**, 291-308.
- Melcangi R. C., Leonelli E., Magnaghi V., Gherardi G., Nobbio L. et Schenone A. (2003) Mifepristone (RU 38486) influences expression of glycoprotein Po and morphological parameters at the level of rat sciatic nerve: in vivo observations. *Exp Neurol* **184**, 930-938.
- Melcangi R. C. et Mensah-Nyagan A. G. (2007). Special issue of Neurochemistry International. In press.
- Mellon S. H. et Griffin L. D. (2002) Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. *Trends Endocrinol Metab* **13**, 35-43.
- Mensah-Nyagan A. G., Feuilloley M., Dupont E., Do-Rego J. L., Leboulenger F., Pelletier G. et Vaudry H. (1994) Immunocytochemical localization and biological activity of 3 beta-

- hydroxysteroid dehydrogenase in the central nervous system of the frog. *J Neurosci* **14**, 7306-7318.
- Mensah-Nyagan A. G., Do-Rego J. L., Feuilloley M., Marcual A., Lange C., Pelletier G. et Vaudry H. (1996a) In vivo and in vitro evidence for the biosynthesis of testosterone in the telencephalon of the female frog. *J Neurochem* **67**, 413-422.
- Mensah-Nyagan A. G., Feuilloley M., Do-Rego J. L., Marcual A., Lange C., Tonon M. C., Pelletier G. et Vaudry H. (1996b) Localization of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase and characterization of testosterone in the brain of the male frog. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1423-1428.
- Mensah-Nyagan A. G., Do-Rego J. L., Beaujean D., Luu-The V., Pelletier G. et Vaudry H. (1999) Neurosteroids: expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the central nervous system. *Pharmacol Rev* **51**, 63-81.
- Mensah-Nyagan A. G., Beaujean D., Luu-The V., Pelletier G. et Vaudry H. (2001a) Anatomical and biochemical evidence for the synthesis of unconjugated and sulfated neurosteroids in amphibians. *Brain Res Brain Res Rev* **37**, 13-24.
- Mensah-Nyagan A. G., Do-Rego J. L., Beaujean D., Luu-The V., Pelletier G. et Vaudry H. (2001b) Regulation of neurosteroid biosynthesis in the frog diencephalon by GABA and endozepines. *Horm Behav* **40**, 218-225.
- Meyer L., Venard C., Schaeffer V., Patte-Mensah C. et Mensah-Nyagan A. G. The biological activity of 3 $\alpha$ -hydroxysteroid oxido-reductase in the spinal cord regulates thermal and mechanical pain thresholds after sciatic nerve injury (soumis).
- Mielke K. et Herdegen T. (2000) JNK and p38 stresskinases--degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system. *Prog Neurobiol* **61**, 45-60.
- Millan M. J. (1999) The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* **57**, 1-164.
- Millan M. J. (2002) Descending control of pain. *Prog Neurobiol* **66**, 355-474.
- Miller D. L., Papayannopoulos I. A., Styles J., Bobin S. A., Lin Y. Y., Biemann K. et Iqbal K. (1993) Peptide compositions of the cerebrovascular and senile plaque core amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Arch Biochem Biophys* **301**, 41-52.
- Miller K. E., Richards B. A. et Kriebel R. M. (2002) Glutamine-, glutamine synthetase-, glutamate dehydrogenase- and pyruvate carboxylase-immunoreactivities in the rat dorsal root ganglion and peripheral nerve. *Brain Res* **945**, 202-211.
- Miller L. K. (1999) An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs. *Trends Cell Biol* **9**, 323-328.

- Miranda S., Opazo C., Larrondo L. F., Munoz F. J., Ruiz F., Leighton F. et Inestrosa N. C. (2000) The role of oxidative stress in the toxicity induced by amyloid beta-peptide in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* **62**, 633-648.
- Misonou H., Morishima-Kawashima M. et Ihara Y. (2000) Oxidative stress induces intracellular accumulation of amyloid beta-protein (Abeta) in human neuroblastoma cells. *Biochemistry* **39**, 6951-6959.
- Mizuno Y., Yoshino H., Ikebe S., Hattori N., Kobayashi T., Shimoda-Matsubayashi S., Matsumine H. et Kondo T. (1998) Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Ann Neurol* **44**, S99-109.
- Mochizucki D. (2004) Serotonin and noradrenaline reuptake inhibitors in animal models of pain. *Hum Psychopharmacol* **19 Suppl 1**, S15-19.
- Mohiuddin L., Fernyhough P. et Tomlinson D. R. (1995) Reduced levels of mRNA encoding endoskeletal and growth-associated proteins in sensory ganglia in experimental diabetes. *Diabetes* **44**, 25-30.
- Monnet F. P., Mahe V., Robel P. et Baulieu E. E. (1995) Neurosteroids, via sigma receptors, modulate the [3H]norepinephrine release evoked by N-methyl-D-aspartate in the rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3774-3778.
- Moore K. A., Kohno T., Karchewski L. A., Scholz J., Baba H. et Woolf C. J. (2002) Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. *J Neurosci* **22**, 6724-6731.
- Morishima Y., Gotoh Y., Zieg J., Barrett T., Takano H., Flavell R., Davis R. J., Shirasaki Y. et Greenberg M. E. (2001) Beta-amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fas ligand. *J Neurosci* **21**, 7551-7560.
- Mosconi T. et Kruger L. (1996) Fixed-diameter polyethylene cuffs applied to the rat sciatic nerve induce a painful neuropathy: ultrastructural morphometric analysis of axonal alterations. *Pain* **64**, 37-57.
- Munger B. L., Bennett G. J. et Kajander K. C. (1992) An experimental painful peripheral neuropathy due to nerve constriction. I. Axonal pathology in the sciatic nerve. *Exp Neurol* **118**, 204-214.
- Murakami K., Fellous A., Baulieu E. E. et Robel P. (2000) Pregnenolone binds to microtubule-associated protein 2 and stimulates microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3579-3584.



- Murialdo G., Nobili F., Rollero A., Gianelli M. V., Copello F., Rodriguez G. et Polleri A. (2000) Hippocampal perfusion and pituitary-adrenal axis in Alzheimer's disease. *Neuropsychobiology* **42**, 51-57.
- Murialdo G., Barreca A., Nobili F., Rollero A., Timossi G., Gianelli M. V., Copello F., Rodriguez G. et Polleri A. (2001) Relationships between cortisol, dehydroepiandrosterone sulphate and insulin-like growth factor-I system in dementia. *J Endocrinol Invest* **24**, 139-146.
- Nagata S. et Golstein P. (1995) The Fas death factor. *Science* **267**, 1449-1456.
- Nagle R. B. (1988) Intermediate filaments: a review of the basic biology. *Am J Surg Pathol* **12 Suppl 1**, 4-16.
- Naik A. K., Tandan S. K., Kumar D. et Dudhgaonkar S. P. (2006) Nitric oxide and its modulators in chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. *Eur J Pharmacol* **530**, 59-69.
- Nakajima T., Kitazawa T., Hamada E., Hazama H., Omata M. et Kurachi Y. (1995) 17beta-Estradiol inhibits the voltage-dependent L-type Ca<sup>2+</sup> currents in aortic smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* **294**, 625-635.
- Näsman B., Olsson T., Backstrom T., Eriksson S., Grankvist K., Viitanen M. et Bucht G. (1991) Serum dehydroepiandrosterone sulfate in Alzheimer's disease and in multi-infarct dementia. *Biol Psychiatry* **30**, 684-690.
- Näsman B., Olsson T., Seckl J. R., Eriksson S., Viitanen M., Bucht G. et Carlström K. (1995) Abnormalities in adrenal androgens, but not of glucocorticoids, in early Alzheimer's disease. *Psychoneuroendocrinology* **20**, 83-94.
- Newmeyer D. D. et Ferguson-Miller S. (2003) Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* **112**, 481-490.
- Nicholson B. et Verma S. (2004) Comorbidities in chronic neuropathic pain. *Pain Med* **5 Suppl 1**, S9-S27.
- Nicholson D. W. (1999) Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* **6**, 1028-1042.
- Nickander K. K., Schmelzer J. D., Rohwer D. A. et Low P. A. (1994) Effect of alpha-tocopherol deficiency on indices of oxidative stress in normal and diabetic peripheral nerve. *J Neurol Sci* **126**, 6-14.
- Nilsen J. et Brinton R. D. (2002) Impact of progestins on estrogen-induced neuroprotection: synergy by progesterone and 19-norprogesterone and antagonism by medroxyprogesterone acetate. *Endocrinology* **143**, 205-212.

- Noda M., Nakanishi H. et Akaike N. (1999) Glutamate release from microglia via glutamate transporter is enhanced by amyloid-beta peptide. *Neuroscience* **92**, 1465-1474.
- Nuytten D., Kupers R., Lammens M., Dom R., Van Hees J. et Gybels J. (1992) Further evidence for myelinated as well as unmyelinated fibre damage in a rat model of neuropathic pain. *Exp Brain Res* **91**, 73-78.
- Oddo S., Caccamo A., Shepherd J. D., Murphy M. P., Golde T. E., Kaye R., Metherate R., Mattson M. P., Akbari Y. et LaFerla F. M. (2003) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* **39**, 409-421.
- Ogryzko V. V., Schiltz R. L., Russanova V., Howard B. H. et Nakatani Y. (1996) The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* **87**, 953-959.
- Olivieri G., Novakovic M., Savaskan E., Meier F., Baysang G., Brockhaus M. et Muller-Spahn F. (2002) The effects of beta-estradiol on SHSY5Y neuroblastoma cells during heavy metal induced oxidative stress, neurotoxicity and beta-amyloid secretion. *Neuroscience* **113**, 849-855.
- Onate S. A., Tsai S. Y., Tsai M. J. et O'Malley B. W. (1995) Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* **270**, 1354-1357.
- Owellen R. J., Hartke C. A., Dickerson R. M. et Hains F. O. (1976) Inhibition of tubulin-microtubule polymerization by drugs of the Vinca alkaloid class. *Cancer Res* **36**, 1499-1502.
- Paglini G., Peris L., Mascotti F., Quiroga S. et Caceres A. (2000) Tau protein function in axonal formation. *Neurochem Res* **25**, 37-42.
- Pappas T. C., Gametchu B. et Watson C. S. (1995) Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding. *Faseb J* **9**, 404-410.
- Paradis E., Douillard H., Koutroumanis M., Goodyer C. et LeBlanc A. (1996) Amyloid beta peptide of Alzheimer's disease downregulates Bcl-2 and upregulates bax expression in human neurons. *J Neurosci* **16**, 7533-7539.
- Parker W. D., Jr., Parks J., Filley C. M. et Kleinschmidt-DeMasters B. K. (1994) Electron transport chain defects in Alzheimer's disease brain. *Neurology* **44**, 1090-1096.
- Parness J. et Horwitz S. B. (1981) Taxol binds to polymerized tubulin in vitro. *J Cell Biol* **91**, 479-487.
- Pasinelli P., Borchelt D. R., Houseweart M. K., Cleveland D. W. et Brown R. H., Jr. (1998) Caspase-1 is activated in neural cells and tissue with amyotrophic lateral sclerosis-

- associated mutations in copper-zinc superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15763-15768.
- Patte-Mensah C., Kappes V., Freund-Mercier M. J., Tsutsui K. et Mensah-Nyagan A. G. (2003) Cellular distribution and bioactivity of the key steroidogenic enzyme, cytochrome P450side chain cleavage, in sensory neural pathways. *J Neurochem* **86**, 1233-1246.
- Patte-Mensah C., Li S. et Mensah-Nyagan A. G. (2004a) Impact of neuropathic pain on the gene expression and activity of cytochrome P450side-chain-cleavage in sensory neural networks. *Cell Mol Life Sci* **61**, 2274-2284.
- Patte-Mensah C., Penning T. M. et Mensah-Nyagan A. G. (2004b) Anatomical and cellular localization of neuroactive 5 alpha/3 alpha-reduced steroid-synthesizing enzymes in the spinal cord. *J Comp Neurol* **477**, 286-299.
- Patte-Mensah C., Kibaly C. et Mensah-Nyagan A. G. (2005) Substance P inhibits progesterone conversion to neuroactive metabolites in spinal sensory circuit: a potential component of nociception. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 9044-9049.
- Patte-Mensah C., Kibaly C., Boudard D., Schaeffer V., Béglé A., Saredi S., Meyer L. et Mensah-Nyagan A. G. (2006) Neurogenic pain and steroid synthesis in the spinal cord. *J Mol Neurosci* **28**, 17-31.
- Payne A. H. et Hales D. B. (2004) Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr Rev* **25**, 947-970.
- Petiot A., Ogier-Denis E., Blommaert E. F., Meijer A. J. et Codogno P. (2000) Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J Biol Chem* **275**, 992-998.
- Petros A. M., Olejniczak E. T. et Fesik S. W. (2004) Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta* **1644**, 83-94.
- Peyron R. et Laurent B. (2001) Aspects cliniques, étiologiques et physiologiques des douleurs centrales. Dans Les douleurs neuropathiques, *Institut UPSA de la douleur*, Paris. p 65-86.
- Pike C. J. (1999) Estrogen modulates neuronal Bcl-xL expression and beta-amyloid-induced apoptosis: relevance to Alzheimer's disease. *J Neurochem* **72**, 1552-1563.
- Plassart-Schiess E. et Baulieu E. E. (2001) Neurosteroids: recent findings. *Brain Res Brain Res Rev* **37**, 133-140.
- Polgár E., Hughes D. I., Riddell J. S., Maxwell D. J., Puskar Z. et Todd A. J. (2003) Selective loss of spinal GABAergic or glycinergic neurons is not necessary for development of thermal hyperalgesia in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Pain* **104**, 229-239.

- Polgár E., Gray S., Riddell J. S. et Todd A. J. (2004) Lack of evidence for significant neuronal loss in laminae I-III of the spinal dorsal horn of the rat in the chronic constriction injury model. *Pain* **111**, 144-150.
- Polgár E., Hughes D. I., Arham A. Z. et Todd A. J. (2005) Loss of neurons from laminae I-III of the spinal dorsal horn is not required for development of tactile allodynia in the spared nerve injury model of neuropathic pain. *J Neurosci* **25**, 6658-6666.
- Polomano R. C., Mannes A. J., Clark U. S. et Bennett G. J. (2001) A painful peripheral neuropathy in the rat produced by the chemotherapeutic drug, paclitaxel. *Pain* **94**, 293-304.
- Polster B. M. et Fiskum G. (2004) Mitochondrial mechanisms of neural cell apoptosis. *J Neurochem* **90**, 1281-1289.
- Poorkaj P., Bird T. D., Wijsman E., Nemens E., Garruto R. M., Anderson L., Andreadis A., Wiederholt W. C., Raskind M. et Schellenberg G. D. (1998) Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Ann Neurol* **43**, 815-825.
- Portenoy R. K. et Lesage P. (1999) Management of cancer pain. *Lancet* **353**, 1695-1700.
- Purring-Koch C. et McLendon G. (2000) Cytochrome c binding to Apaf-1: the effects of dATP and ionic strength. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11928-11931.
- Qiu J., Nesic O., Ye Z., Rea H., Westlund K. N., Xu G. Y., McAdoo D., Hulsebosch C. E. et Perez-Polo J. R. (2001) Bcl-xL expression after contusion to the rat spinal cord. *J Neurotrauma* **18**, 1267-1278.
- Qu X., Yu J., Bhagat G., Furuya N., Hibshoosh H., Troxel A., Rosen J., Eskelinen E. L., Mizushima N., Ohsumi Y., et coll. (2003) Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest* **112**, 1809-1820.
- Ramer M. S., French G. D. et Bisby M. A. (1997) Wallerian degeneration is required for both neuropathic pain and sympathetic sprouting into the DRG. *Pain* **72**, 71-78.
- Rao L., Perez D. et White E. (1996) Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol* **135**, 1441-1455.
- Rasmuson S., Näsman B., Carlström K. et Olsson T. (2002) Increased levels of adrenocortical and gonadal hormones in mild to moderate Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* **13**, 74-79.
- Ravagnan L., Roumier T. et Kroemer G. (2002) Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J Cell Physiol* **192**, 131-137.
- Reddy D. S. (2004) Testosterone modulation of seizure susceptibility is mediated by neurosteroids 3alpha-androstanediol and 17beta-estradiol. *Neuroscience* **129**, 195-207.

- Reed J. C., Jurgensmeier J. M. et Matsuyama S. (1998) Bcl-2 family proteins and mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1366**, 127-137.
- Robakis N. K., Ramakrishna N., Wolfe G. et Wisniewski H. M. (1987) Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the cerebrovascular and the neuritic plaque amyloid peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 4190-4194.
- Roof R. L. et Hall E. D. (2000) Gender differences in acute CNS trauma and stroke: neuroprotective effects of estrogen and progesterone. *J Neurotrauma* **17**, 367-388.
- Rowinsky E. K., Donehower R. C., Jones R. J. et Tucker R. W. (1988) Microtubule changes and cytotoxicity in leukemic cell lines treated with taxol. *Cancer Res* **48**, 4093-4100.
- Roytta M., Wei H. et Pertovaara A. (1999) Spinal nerve ligation-induced neuropathy in the rat: sensory disorders and correlation between histology of the peripheral nerves. *Pain* **80**, 161-170.
- Russell J. W., Sullivan K. A., Windebank A. J., Herrmann D. N. et Feldman E. L. (1999) Neurons undergo apoptosis in animal and cell culture models of diabetes. *Neurobiol Dis* **6**, 347-363.
- Sáez-Valero J., Fodero L. R., White A. R., Barrow C. J. et Small D. H. (2003) Acetylcholinesterase is increased in mouse neuronal and astrocyte cultures after treatment with beta-amyloid peptides. *Brain Res* **965**, 283-286.
- Sakahira H., Enari M. et Nagata S. (1998) Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* **391**, 96-99.
- Saleh A., Srinivasula S. M., Acharya S., Fishel R. et Alnemri E. S. (1999) Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. *J Biol Chem* **274**, 17941-17945.
- Samejima K., Tone S. et Earnshaw W. C. (2001) CAD/DFF40 nuclease is dispensable for high molecular weight DNA cleavage and stage I chromatin condensation in apoptosis. *J Biol Chem* **276**, 45427-45432.
- Sanchez I., Xu C. J., Juo P., Kakizaka A., Blenis J. et Yuan J. (1999) Caspase-8 is required for cell death induced by expanded polyglutamine repeats. *Neuron* **22**, 623-633.
- Saredi S., Patte-Mensah C., Melcangi R. C. et Mensah-Nyagan A. G. (2005) Effect of streptozotocin-induced diabetes on the gene expression and biological activity of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat spinal cord. *Neuroscience* **135**, 869-877.
- Sato N., Kamino K., Tateishi K., Satoh T., Nishiwaki Y., Yoshiiwa A., Miki T. et Ogihara T. (1997) Elevated amyloid beta protein(1-40) level induces CREB phosphorylation at serine-

- 133 via p44/42 MAP kinase (Erk1/2)-dependent pathway in rat pheochromocytoma PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **232**, 637-642.
- Savill J. (1998) Apoptosis. Phagocytic docking without shocking. *Nature* **392**, 442-443.
- Schaeffer V., Patte-Mensah C., Eckert A. et Mensah-Nyagan A. G. (2006) Modulation of neurosteroid production in human neuroblastoma cells by Alzheimer's disease key proteins. *J Neurobiol* **66**, 868-881.
- Scheuermann S., Hambsch B., Hesse L., Stumm J., Schmidt C., Beher D., Bayer T. A., Beyreuther K. et Multhaup G. (2001) Homodimerization of amyloid precursor protein and its implication in the amyloidogenic pathway of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* **276**, 33923-33929.
- Scheuner D., Eckman C., Jensen M., Song X., Citron M., Suzuki N., Bird T. D., Hardy J., Hutton M., Kukull W., et coll. (1996) Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* **2**, 864-870.
- Schiff P. B. et Horwitz S. B. (1980) Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 1561-1565.
- Schlesinger P. H., Gross A., Yin X. M., Yamamoto K., Saito M., Waksman G. et Korsmeyer S. J. (1997) Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 11357-11362.
- Schmeichel A. M., Schmelzer J. D. et Low P. A. (2003) Oxidative injury and apoptosis of dorsal root ganglion neurons in chronic experimental diabetic neuropathy. *Diabetes* **52**, 165-171.
- Scholz J. et Woolf C. J. (2002) Can we conquer pain? *Nat Neurosci* **5 Suppl**, 1062-1067.
- Scholz J., Broom D. C., Youn D. H., Mills C. D., Kohno T., Suter M. R., Moore K. A., Decosterd I., Coggeshall R. E. et Woolf C. J. (2005) Blocking caspase activity prevents transsynaptic neuronal apoptosis and the loss of inhibition in lamina II of the dorsal horn after peripheral nerve injury. *J Neurosci* **25**, 7317-7323.
- Schubert D., Behl C., Lesley R., Brack A., Dargusch R., Sagara Y. et Kimura H. (1995) Amyloid peptides are toxic via a common oxidative mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 1989-1993.
- Schumacher M., Guennoun R., Robert F., Carelli C., Gago N., Ghoumari A., Gonzalez Deniselle M. C., Gonzalez S. L., Ibanez C., Labombarda F., et coll. (2004) Local synthesis and dual actions of progesterone in the nervous system: neuroprotection and myelination. *Growth Horm IGF Res* **14 Suppl A**, S18-33.

- Schumacher M., Guennoun R., Ghoumari A., Massaad C., Robert F., El-Etr M., Akwa Y., Rajkowski K. et Baulieu E. E. (2007) Novel perspectives for progesterone in hormone replacement therapy, with special reference to the nervous system. *Endocr Rev* **28**, 387-439.
- Schweichel J. U. et Merker H. J. (1973) The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* **7**, 253-266.
- Scott J. N., Clark A. W. et Zochodne D. W. (1999) Neurofilament and tubulin gene expression in progressive experimental diabetes: failure of synthesis and export by sensory neurons. *Brain* **122** ( Pt 11), 2109-2118.
- Selkoe D. J., Abraham C. R., Podlisny M. B. et Duffy L. K. (1986) Isolation of low-molecular-weight proteins from amyloid plaque fibers in Alzheimer's disease. *J Neurochem* **46**, 1820-1834.
- Selkoe D. J. (1996) Amyloid beta-protein and the genetics of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* **271**, 18295-18298.
- Selkoe D. J. (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* **81**, 741-766.
- Selkoe D. J. (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* **298**, 789-791.
- Seltzer Z., Dubner R. et Shir Y. (1990) A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* **43**, 205-218.
- Selye H. (1942) Correlations between the chemical structure and the pharmacological actions of the steroids. *Endocrinology* **30**, 437-452.
- Sereda M. W., Meyer zu Horste G., Suter U., Uzma N. et Nave K. A. (2003) Therapeutic administration of progesterone antagonist in a model of Charcot-Marie-Tooth disease (CMT-1A). *Nat Med* **9**, 1533-1537.
- Sharpe J. C., Arnoult D. et Youle R. J. (2004) Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members. *Biochim Biophys Acta* **1644**, 107-113.
- Shintani T. et Klionsky D. J. (2004) Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* **306**, 990-995.
- Siddall P., Xu C. L. et Cousins M. (1995) Allodynia following traumatic spinal cord injury in the rat. *Neuroreport* **6**, 1241-1244.
- Siddall P. J., Taylor D. A., McClelland J. M., Rutkowski S. B. et Cousins M. J. (1999) Pain report and the relationship of pain to physical factors in the first 6 months following spinal cord injury. *Pain* **81**, 187-197.

- Sima A. A., Zhang W. X., Tze W. J., Tai J. et Nathaniel V. (1988) Diabetic neuropathy in STZ-induced diabetic rat and effect of allogeneic islet cell transplantation. Morphometric analysis. *Diabetes* **37**, 1129-1136.
- Sima A. A. et Sugimoto K. (1999) Experimental diabetic neuropathy: an update. *Diabetologia* **42**, 773-788.
- Simmons Z. et Feldman E. L. (2002) Update on diabetic neuropathy. *Curr Opin Neurol* **15**, 595-603.
- Simoncini T., Hafezi-Moghadam A., Brazil D. P., Ley K., Chin W. W. et Liao J. K. (2000) Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* **407**, 538-541.
- Simoncini T., Mannella P., Fornari L., Caruso A., Varone G. et Genazzani A. R. (2004) Genomic and non-genomic effects of estrogens on endothelial cells. *Steroids* **69**, 537-542.
- Singer C. A., Rogers K. L. et Dorsa D. M. (1998) Modulation of Bcl-2 expression: a potential component of estrogen protection in NT2 neurons. *Neuroreport* **9**, 2565-2568.
- Singh I. N., Sorrentino G. et Kanfer J. N. (1997) Amyloid beta protein (25-35) stimulation of phospholipase C in LA-N-2 cells. *J Neurochem* **69**, 252-258.
- Small D. H. et McLean C. A. (1999) Alzheimer's disease and the amyloid beta protein: What is the role of amyloid? *J Neurochem* **73**, 443-449.
- Small D. H., Mok S. S. et Bornstein J. C. (2001) Alzheimer's disease and Abeta toxicity: from top to bottom. *Nat Rev Neurosci* **2**, 595-598.
- Smith M. A., Richey Harris P. L., Sayre L. M., Beckman J. S. et Perry G. (1997) Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *J Neurosci* **17**, 2653-2657.
- Smith M. A., Hirai K., Hsiao K., Pappolla M. A., Harris P. L., Siedlak S. L., Tabaton M. et Perry G. (1998) Amyloid-beta deposition in Alzheimer transgenic mice is associated with oxidative stress. *J Neurochem* **70**, 2212-2215.
- Soldani C. et Scovassi A. I. (2002) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. *Apoptosis* **7**, 321-328.
- Spencer T. E., Jenster G., Burcin M. M., Allis C. D., Zhou J., Mizzen C. A., McKenna N. J., Onate S. A., Tsai S. Y., Tsai M. J., et coll. (1997) Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* **389**, 194-198.
- Spillantini M. G., Murrell J. R., Goedert M., Farlow M. R., Klug A. et Ghetti B. (1998) Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7737-7741.



- Srinivasan S., Stevens M. et Wiley J. W. (2000) Diabetic peripheral neuropathy: evidence for apoptosis and associated mitochondrial dysfunction. *Diabetes* **49**, 1932-1938.
- Srinivasula S. M., Ahmad M., Fernandes-Alnemri T. et Alnemri E. S. (1998) Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell* **1**, 949-957.
- Stadelmann C., Deckwerth T. L., Srinivasan A., Bancher C., Bruck W., Jellinger K. et Lassmann H. (1999) Activation of caspase-3 in single neurons and autophagic granules of granulovacuolar degeneration in Alzheimer's disease. Evidence for apoptotic cell death. *Am J Pathol* **155**, 1459-1466.
- Stamer K., Vogel R., Thies E., Mandelkow E. et Mandelkow E. M. (2002) Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *J Cell Biol* **156**, 1051-1063.
- Steel J. H., Terenghi G., Chung J. M., Na H. S., Carlton S. M. et Polak J. M. (1994) Increased nitric oxide synthase immunoreactivity in rat dorsal root ganglia in a neuropathic pain model. *Neurosci Lett* **169**, 81-84.
- Stein D. G. (2001) Brain damage, sex hormones and recovery: a new role for progesterone and estrogen? *Trends Neurosci* **24**, 386-391.
- Steiner H., Winkler E., Edbauer D., Prokop S., Basset G., Yamasaki A., Kostka M. et Haass C. (2002) PEN-2 is an integral component of the gamma-secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin. *J Biol Chem* **277**, 39062-39065.
- Su J. H., Anderson A. J., Cummings B. J. et Cotman C. W. (1994) Immunohistochemical evidence for apoptosis in Alzheimer's disease. *Neuroreport* **5**, 2529-2533.
- Sunderland T., Merrill C. R., Harrington M. G., Lawlor B. A., Molchan S. E., Martinez R. et Murphy D. L. (1989) Reduced plasma dehydroepiandrosterone concentrations in Alzheimer's disease. *Lancet* **2**, 570.
- Susin S. A., Lorenzo H. K., Zamzami N., Marzo I., Snow B. E., Brothers G. M., Mangion J., Jacotot E., Costantini P., Loeffler M., et coll. (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**, 441-446.
- Syntichaki P. et Tavernarakis N. (2003) The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology? *Nat Rev Neurosci* **4**, 672-684.
- Tabner B. J., El-Agnaf O. M., Turnbull S., German M. J., Paleologou K. E., Hayashi Y., Cooper L. J., Fullwood N. J. et Allsop D. (2005) Hydrogen peroxide is generated during the very early stages of aggregation of the amyloid peptides implicated in Alzheimer disease and familial British dementia. *J Biol Chem* **280**, 35789-35792.

- Takasugi N., Tomita T., Hayashi I., Tsuruoka M., Niimura M., Takahashi Y., Thinakaran G. et Iwatsubo T. (2003) The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. *Nature* **422**, 438-441.
- Tal M. (1996) A novel antioxidant alleviates heat hyperalgesia in rats with an experimental painful peripheral neuropathy. *Neuroreport* **7**, 1382-1384.
- Tamagno E., Robino G., Obbili A., Bardini P., Aragno M., Parola M. et Danni O. (2003) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 4-hydroxynonenal mediate amyloid beta-induced neuronal apoptosis by activating JNKs and p38MAPK. *Exp Neurol* **180**, 144-155.
- Tamatani M., Ogawa S., Niitsu Y. et Tohyama M. (1998) Involvement of Bcl-2 family and caspase-3-like protease in NO-mediated neuronal apoptosis. *J Neurochem* **71**, 1588-1596.
- Tanaka T., Iqbal K., Trenkner E., Liu D. J. et Grundke-Iqbal I. (1995) Abnormally phosphorylated tau in SY5Y human neuroblastoma cells. *FEBS Lett* **360**, 5-9.
- Tanner K. D., Levine J. D. et Topp K. S. (1998a) Microtubule disorientation and axonal swelling in unmyelinated sensory axons during vincristine-induced painful neuropathy in rat. *J Comp Neurol* **395**, 481-492.
- Tanner K. D., Reichling D. B. et Levine J. D. (1998b) Nociceptor hyper-responsiveness during vincristine-induced painful peripheral neuropathy in the rat. *J Neurosci* **18**, 6480-6491.
- Terwel D., Dewachter I. et Van Leuven F. (2002) Axonal transport, tau protein, and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med* **2**, 151-165.
- Tetel M. J. (2000) Nuclear receptor coactivators in neuroendocrine function. *J Neuroendocrinol* **12**, 927-932.
- Thomas A. J., Nockels R. P., Pan H. Q., Shaffrey C. I. et Chopp M. (1999) Progesterone is neuroprotective after acute experimental spinal cord trauma in rats. *Spine* **24**, 2134-2138.
- Thomas D. A., Ren K., Besse D., Ruda M. A. et Dubner R. (1996) Application of nitric oxide synthase inhibitor, N omega-nitro-L-arginine methyl ester, on injured nerve attenuates neuropathy-induced thermal hyperalgesia in rats. *Neurosci Lett* **210**, 124-126.
- Thomas P., Zhu Y. et Pace M. (2002) Progestin membrane receptors involved in the meiotic maturation of teleost oocytes: a review with some new findings. *Steroids* **67**, 511-517.
- Thompson C. B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456-1462.
- Thornberry N. A., Rano T. A., Peterson E. P., Rasper D. M., Timkey T., Garcia-Calvo M., Houtzager V. M., Nordstrom P. A., Roy S., Vaillancourt J. P., et coll. (1997) A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and

- granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* **272**, 17907-17911.
- Thornberry N. A. (1998) Caspases: key mediators of apoptosis. *Chem Biol* **5**, R97-103.
- Thornberry N. A. et Lazebnik Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science* **281**, 1312-1316.
- Thumm M., Egner R., Koch B., Schlumpberger M., Straub M., Veenhuis M. et Wolf D. H. (1994) Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **349**, 275-280.
- Topp K. S., Tanner K. D. et Levine J. D. (2000) Damage to the cytoskeleton of large diameter sensory neurons and myelinated axons in vincristine-induced painful peripheral neuropathy in the rat. *J Comp Neurol* **424**, 563-576.
- Troy C. M., Rabacchi S. A., Friedman W. J., Frappier T. F., Brown K. et Shelanski M. L. (2000) Caspase-2 mediates neuronal cell death induced by beta-amyloid. *J Neurosci* **20**, 1386-1392.
- Truss M., Chalepakis G. et Beato M. (1990) Contacts between steroid hormone receptors and thymines in DNA: an interference method. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 7180-7184.
- Truss M., Chalepakis G., Slater E. P., Mader S. et Beato M. (1991) Functional interaction of hybrid response elements with wild-type and mutant steroid hormone receptors. *Mol Cell Biol* **11**, 3247-3258.
- Tsujimoto Y. et Shimizu S. (2005) Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death Differ* **12 Suppl 2**, 1528-1534.
- Tsukada M. et Ohsumi Y. (1993) Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **333**, 169-174.
- Turk J., Corbett J. A., Ramanadham S., Bohrer A. et McDaniel M. L. (1993) Biochemical evidence for nitric oxide formation from streptozotocin in isolated pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun* **197**, 1458-1464.
- Turner P. R., O'Connor K., Tate W. P. et Abraham W. C. (2003) Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog Neurobiol* **70**, 1-32.
- Ueda K., Shinohara S., Yagami T., Asakura K. et Kawasaki K. (1997) Amyloid beta protein potentiates  $\text{Ca}^{2+}$  influx through L-type voltage-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  channels: a possible involvement of free radicals. *J Neurochem* **68**, 265-271.
- Vanden Berghe T., Kalai M., Denecker G., Meeus A., Saelens X. et Vandenabeele P. (2006) Necrosis is associated with IL-6 production but apoptosis is not. *Cell Signal* **18**, 328-335.

- Vanhalewyn M. et Cerexhe F. (2003) Recommandations de bonne pratique face à la douleur chronique. *Louvain Med* **122**, 435-443.
- VanLandingham J. W., Cutler S. M., Virmani S., Hoffman S. W., Covey D. F., Krishnan K., Hammes S. R., Jamnongjit M. et Stein D. G. (2006) The enantiomer of progesterone acts as a molecular neuroprotectant after traumatic brain injury. *Neuropharmacology* **51**, 1078-1085.
- Varadarajan S., Yatin S., Aksenova M. et Butterfield D. A. (2000) Review: Alzheimer's amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity. *J Struct Biol* **130**, 184-208.
- Vassar R. et Citron M. (2000) Abeta-generating enzymes: recent advances in beta- and gamma-secretase research. *Neuron* **27**, 419-422.
- Veiga S., Azcoitia I. et Garcia-Segura L. M. (2005) Extragonadal synthesis of estradiol is protective against kainic acid excitotoxic damage to the hippocampus. *Neuroreport* **16**, 1599-1603.
- Verge V. M., Xu Z., Xu X. J., Wiesenfeld-Hallin Z. et Hokfelt T. (1992) Marked increase in nitric oxide synthase mRNA in rat dorsal root ganglia after peripheral axotomy: in situ hybridization and functional studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 11617-11621.
- Verhagen A. M., Ekert P. G., Pakusch M., Silke J., Connolly L. M., Reid G. E., Moritz R. L., Simpson R. J. et Vaux D. L. (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* **102**, 43-53.
- Verheij M., Bose R., Lin X. H., Yao B., Jarvis W. D., Grant S., Birrer M. J., Szabo E., Zon L. I., Kyriakis J. M., et coll. (1996) Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature* **380**, 75-79.
- Vickers J. C., Dickson T. C., Adlard P. A., Saunders H. L., King C. E. et McCormack G. (2000) The cause of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* **60**, 139-165.
- Vincent A. M., Russell J. W., Low P. et Feldman E. L. (2004) Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr Rev* **25**, 612-628.
- Viswanath V., Wu Y., Boonplueang R., Chen S., Stevenson F. F., Yantiri F., Yang L., Beal M. F. et Andersen J. K. (2001) Caspase-9 activation results in downstream caspase-8 activation and bid cleavage in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease. *J Neurosci* **21**, 9519-9528.

- Wang J., Tung Y. C., Wang Y., Li X. T., Iqbal K. et Grundke-Iqbal I. (2001a) Hyperphosphorylation and accumulation of neurofilament proteins in Alzheimer disease brain and in okadaic acid-treated SY5Y cells. *FEBS Lett* **507**, 81-87.
- Wang L. X. et Wang Z. J. (2003) Animal and cellular models of chronic pain. *Adv Drug Deliv Rev* **55**, 949-965.
- Wang M. S., Fang G., Culver D. G., Davis A. A., Rich M. M. et Glass J. D. (2001b) The WldS protein protects against axonal degeneration: a model of gene therapy for peripheral neuropathy. *Ann Neurol* **50**, 773-779.
- Wang X., Dykens J. A., Perez E., Liu R., Yang S., Covey D. F. et Simpkins J. W. (2006) Neuroprotective effects of 17beta-estradiol and nonfeminizing estrogens against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> toxicity in human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Mol Pharmacol* **70**, 395-404.
- Watanabe M., Tsukiyama T. et Hatakeyama S. (2007) Protection of vincristine-induced neuropathy by WldS expression and the independence of the activity of Nmnat1. *Neurosci Lett* **411**, 228-232.
- Weick M., Cherkas P. S., Hartig W., Pannicke T., Uckermann O., Bringmann A., Tal M., Reichenbach A. et Hanani M. (2003) P2 receptors in satellite glial cells in trigeminal ganglia of mice. *Neuroscience* **120**, 969-977.
- Weill-Engerer S., David J. P., Sazdovitch V., Liere P., Eychenne B., Pianos A., Schumacher M., Delacourte A., Baulieu E. E. et Akwa Y. (2002) Neurosteroid quantification in human brain regions: comparison between Alzheimer's and nondemented patients. *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 5138-5143.
- Weinberg D. H., Simovic D., Isner J. et Ropper A. H. (2001) Chronic ischemic monomelic neuropathy from critical limb ischemia. *Neurology* **57**, 1008-1012.
- Weiner M. F., Vobach S., Svetlik D. et Risser R. C. (1993) Cortisol secretion and Alzheimer's disease progression: a preliminary report. *Biol Psychiatry* **34**, 158-161.
- Weingarten M. D., Lockwood A. H., Hwo S. Y. et Kirschner M. W. (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 1858-1862.
- Weng H. R., Cordella J. V. et Dougherty P. M. (2003) Changes in sensory processing in the spinal dorsal horn accompany vincristine-induced hyperalgesia and allodynia. *Pain* **103**, 131-138.
- West M. J., Coleman P. D., Flood D. G. et Troncoso J. C. (1994) Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet* **344**, 769-772.
- Whiteside G. T. et Munglani R. (2001) Cell death in the superficial dorsal horn in a model of neuropathic pain. *J Neurosci Res* **64**, 168-173.

- Whitson J. S., Selkoe D. J. et Cotman C. W. (1989) Amyloid beta protein enhances the survival of hippocampal neurons in vitro. *Science* **243**, 1488-1490.
- Wilquet V. et De Strooper B. (2004) Amyloid-beta precursor protein processing in neurodegeneration. *Curr Opin Neurobiol* **14**, 582-588.
- Wilson K. P., Black J. A., Thomson J. A., Kim E. E., Griffith J. P., Navia M. A., Murcko M. A., Chambers S. P., Aldape R. A., Raybuck S. A., et coll. (1994) Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature* **370**, 270-275.
- Witman G. B., Cleveland D. W., Weingarten M. D. et Kirschner M. W. (1976) Tubulin requires tau for growth onto microtubule initiating sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**, 4070-4074.
- Woolf C. J. et Mannion R. J. (1999) Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet* **353**, 1959-1964.
- Woolf C. J. et Salter M. W. (2000) Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* **288**, 1765-1769.
- Woolf C. J. (2004) Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Ann Intern Med* **140**, 441-451.
- Wozniak A., Hutchison R. E., Morris C. M. et Hutchison J. B. (1998) Neuroblastoma and Alzheimer's disease brain cells contain aromatase activity. *Steroids* **63**, 263-267.
- Wright D. W., Kellermann A. L., Hertzberg V. S., Clark P. L., Frankel M., Goldstein F. C., Salomone J. P., Dent L. L., Harris O. A., Ander D. S., et coll. (2007) ProTECT: a randomized clinical trial of progesterone for acute traumatic brain injury. *Ann Emerg Med* **49**, 391-402, 402 e391-392.
- Wu M., Ding H. F. et Fisher D.E. (2001) Apoptosis: molecular mechanisms. *Encyclopedia of Life Sciences*.
- Wu T. W., Wang J. M., Chen S. et Brinton R. D. (2005) 17Beta-estradiol induced Ca<sup>2+</sup> influx via L-type calcium channels activates the Src/ERK/cyclic-AMP response element binding protein signal pathway and BCL-2 expression in rat hippocampal neurons: a potential initiation mechanism for estrogen-induced neuroprotection. *Neuroscience* **135**, 59-72.
- Wyllie A. H. (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* **284**, 555-556.
- Yagihashi S., Kamijo M., Ido Y. et Mirrlees D. J. (1990a) Effects of long-term aldose reductase inhibition on development of experimental diabetic neuropathy. Ultrastructural and morphometric studies of sural nerve in streptozocin-induced diabetic rats. *Diabetes* **39**, 690-696.

- Yagihashi S., Kamijo M. et Watanabe K. (1990b) Reduced myelinated fiber size correlates with loss of axonal neurofilaments in peripheral nerve of chronically streptozotocin diabetic rats. *Am J Pathol* **136**, 1365-1373.
- Yamakawa H., Banno Y., Nakashima S., Yoshimura S., Sawada M., Nishimura Y., Nozawa Y. et Sakai N. (2001) Crucial role of calpain in hypoxic PC12 cell death: calpain, but not caspases, mediates degradation of cytoskeletal proteins and protein kinase C-alpha and -delta. *Neurol Res* **23**, 522-530.
- Yamamoto H., Uchigata Y. et Okamoto H. (1981) DNA strand breaks in pancreatic islets by in vivo administration of alloxan or streptozotocin. *Biochem Biophys Res Commun* **103**, 1014-1020.
- Yang D. S., Tandon A., Chen F., Yu G., Yu H., Arawaka S., Hasegawa H., Duthie M., Schmidt S. D., Ramabhadran T. V., et coll. (2002) Mature glycosylation and trafficking of nicastrin modulate its binding to presenilins. *J Biol Chem* **277**, 28135-28142.
- Yang J., Liu X., Bhalla K., Kim C. N., Ibrado A. M., Cai J., Peng T. I., Jones D. P. et Wang X. (1997a) Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* **275**, 1129-1132.
- Yang X., Khosravi-Far R., Chang H. Y. et Baltimore D. (1997b) Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell* **89**, 1067-1076.
- Yankner B. A. (1996) New clues to Alzheimer's disease: unraveling the roles of amyloid and tau. *Nat Med* **2**, 850-852.
- Yao X. L., Liu J., Lee E., Ling G. S. et McCabe J. T. (2005) Progesterone differentially regulates pro- and anti-apoptotic gene expression in cerebral cortex following traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* **22**, 656-668.
- Yao Z. X., Brown R. C., Teper G., Greeson J. et Papadopoulos V. (2002) 22R-Hydroxycholesterol protects neuronal cells from beta-amyloid-induced cytotoxicity by binding to beta-amyloid peptide. *J Neurochem* **83**, 1110-1119.
- Yatin S. M., Varadarajan S., Link C. D. et Butterfield D. A. (1999) In vitro and in vivo oxidative stress associated with Alzheimer's amyloid beta-peptide (1-42). *Neurobiol Aging* **20**, 325-330; discussion 339-342.
- Yorimitsu T. et Klionsky D. J. (2005) Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ* **12 Suppl 2**, 1542-1552.
- Yoritaka A., Hattori N., Uchida K., Tanaka M., Stadtman E. R. et Mizuno Y. (1996) Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2696-2701.

- Yu W., Kauppila T., Hultenby K., Persson J. K., Xu X. J. et Wiesenfeld-Hallin Z. (2000) Photochemically-induced ischemic injury of the rat sciatic nerve: a light- and electron microscopic study. *J Peripher Nerv Syst* **5**, 209-217.
- Yu W. H. (1989) Survival of motoneurons following axotomy is enhanced by lactation or by progesterone treatment. *Brain Res* **491**, 379-382.
- Yuan J. et Yankner B. A. (2000) Apoptosis in the nervous system. *Nature* **407**, 802-809.
- Zhang Y., Tounekti O., Akerman B., Goodyer C. G. et LeBlanc A. (2001) 17-beta-estradiol induces an inhibitor of active caspases. *J Neurosci* **21**, RC176.
- Zhong J., Iqbal K. et Grundke-Iqbal I. (1999) Hyperphosphorylated tau in SY5Y cells: similarities and dissimilarities to abnormally hyperphosphorylated tau from Alzheimer disease brain. *FEBS Lett* **453**, 224-228.
- Zhu Y., Bond J. et Thomas P. (2003a) Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2237-2242.
- Zhu Y., Rice C. D., Pang Y., Pace M. et Thomas P. (2003b) Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2231-2236.
- Ziegler U. et Groscurth P. (2004) Morphological features of cell death. *News Physiol Sci* **19**, 124-128.
- Zimmermann M. (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* **16**, 109-110.
- Zimmermann M. (2001) Pathobiology of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* **429**, 23-37.



## **CURRICULUM VITAE**

**SCHAEFFER Véronique,**

Date of birth: 12 june 1979 in Bitché, France.  
Nationality: French.

**Personal address:**

2 rue du Général Ganeval  
F-67000 Strasbourg  
Cell Phone number: +33 687 715 854

**Work address:**

Institut des Neurosciences Cellulaires et  
Intégratives  
UMR7168/LC2 CNRS-ULP  
Groupe Stéroïdes et Système Nociceptif  
21 rue René Descartes  
F-67084 Strasbourg cedex  
Office number: +33 30 241 455  
Fax: +33 388 613 347  
e-mail: vschaeffer@neurochem.u-strasbg.fr

<b>EMPLOYMENT AND FELLOWSHIP</b>
----------------------------------

**Sept 2004-Novembre 2007**

**INTERNATIONAL PhD in NEUROSCIENCE: joint supervision between the University Louis Pasteur, Strasbourg, France and the University of Basel, Switzerland.**

Advisor: Pr Guy Mensah-Nyagan, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, UMR7168/LC2 CNRS-ULP, Group Stéroïdes et Système Nociceptif, Strasbourg, France.

Co-advisor: Dr Anne Eckert, Neurobiology research Laboratory, Psychiatric University Clinic, Basel, Switzerland.

Main subject of research: Role of Neurosteroids in the Prevention against Neurodegenerative Disorders.

<b>ACADEMIC BACKGROUND</b>
----------------------------

**2004-2007 : PhD student in NEUROSCIENCE** (University Louis Pasteur, Strasbourg, France and University of Basel, Switzerland).

Advisor: Pr Guy Mensah-Nyagan, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, UMR7168/LC2 CNRS-ULP, Group Stéroïdes et Système Nociceptif, Strasbourg, France.

Co-advisor: Dr Anne Eckert, Neurobiology Research Laboratory, Psychiatric University Clinic, Basel, Switzerland.

Main research topics: Neuroactive steroids, neurosteroids, neurodegeneration, Alzheimer Disease and pain modulation.

**2002-04: MASTER'S DEGREE in NEUROSCIENCES** at the University Louis Pasteur, Strasbourg.

Advisor: Dr Jean-Paul Fuchs

Specialities: Neurodegenerative Disease  
Molecular Neurobiology and Neurobiochemistry  
Neurobiology and Pharmacology of Behaviours

**1999-02: BACHELOR'S DEGREE in BIOLOGY** at the University Louis Pasteur, Strasbourg.

Specialities: Physiology and Cellular Biology  
Neuronal and Cellular physiology  
Physiology of systems

**1997-99:** Basic Medical Course Study, faculty of Medicine, University Louis Pasteur, Strasbourg.

**1997:** Higher Certificate of Education.

<b>COMPUTER EXPERIENCE</b>
----------------------------

Microsoft Windows System (Microsoft Excel, Power Point, Word).  
Statistica, Adobe Photoshop.

<b>LANGUAGES</b>
------------------

French: native language  
 English: good knowledge  
 German: good knowledge

<b>RESEARCH EXPERIENCES</b>
-----------------------------

**Field of research:**

**2003-2004:** Training in Neurosciences.

Laboratory of Physiopathology of the Nervous System INSERM U575,  
 Strasbourg

Research Topic: Spatio-temporal expression of the PrP-like protein Doppel in the brain of Nagasaki *Prnp*<sup>-/-</sup> and wild-type mice.

**2004:** Training in the Centre for Applied Physiology Studies, Strasbourg

Research Topic: Electroencephalogram of sleep states.

**2003:** Technical training in the Laboratory of Cognitive and Behavioural  
 Neurosciences, Strasbourg

Research topic: Specific lesion of cholinergic neurons in the medial septum by intraseptal injections of 192IgG-Saporin.

**2003:** Training in the laboratory of Cellular and Integrative Neuroscience, Strasbourg

Research topic: Evidence for a nicotinic transmission in lamina X of rat spinal cord slices by patch clamp.

**Fields of expertise:**

Neurobiology, neurophysiology, neurochemistry, neuroendocrinology

**Methodology:**

- Surgery : Sciatic nerve ligation, adrenalectomy
- Cell culture
- Perfusion, dissections of organs, removal of spinal cord, brain, dorsal root ganglia.
- ARN and proteins extractions
- Immunology: Immunohistochemistry, monodimensional and two-dimensional Western blot.
- Biochemistry : Pulse-Chase, HPLC-Flo/One (continuous flow detection of radioactive compounds)
- TUNEL
- MTT assay
- Molecular biology: real-time RT-PCR, qualitative PCR.

### Scientific societies:

Member of the Federation of European Neuroscience Societies (FENS)  
Member of the French National Society of Neurosciences

<b>PUBLICATIONS</b>
---------------------

#### - 2006 -

(1) **Schaeffer V.**, Patte-Mensah C., Eckert A. and Mensah-Nyagan A.G. Modulation of neurosteroid production in human neuroblastoma cells by Alzheimer's disease key proteins. *Journal of Neurobiology*, 2006; 66(8):868-881.

(2) Patte-Mensah C., Kibaly C., Boudard D., **Schaeffer V.**, Béglé A., Saredi S., Meyer L. and Mensah-Nyagan A.G. Neurogenic pain and steroid synthesis in the spinal cord. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2006; 28(1):17-34.

#### - 2007 -

(3) Mensah-Nyagan A.G., Saredi S., **Schaeffer V.**, Kibaly C., Meyer L., Melcangi R.C. and Patte-Mensah C. Assessment of neuroactive steroid formation in diabetic rat spinal cord using High Performance Liquid Chromatography and Continuous Flow Scintillation Detection. *Neurochemistry International*, 2007. *In press, available online* [doi:10.1016/j.neuint.2007.06.010](https://doi.org/10.1016/j.neuint.2007.06.010).

(4) Mensah-Nyagan A.G., Kibaly C., **Schaeffer V.**, Venard C., Meyer L. and Patte-Mensah C. Endogenous steroid production in the spinal cord and potential involvement in neuropathic pain modulation. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2007. *In press*.

(5) **Schaeffer V.**, Patte-Mensah C., Eckert A. and Mensah-Nyagan A.G. Selective regulation of neurosteroid biosynthesis in human neuroblastoma cells under hydrogen peroxide-induced oxidative stress conditions. *Neuroscience*. *In press*.

(6) **Schaeffer V.**, Patte-Mensah C., Eckert A. and Mensah-Nyagan A.G. Non-toxic doses of  $\beta$ -amyloid peptide selectively control neurosteroidogenesis in human neuroblastoma cells. *Submitted*.

(7) Meyer L., Venard C., **Schaeffer V.**, Patte-Mensah C. and Mensah-Nyagan A.G. The biological activity of 3 $\alpha$ -hydroxysteroid oxido-reductase in the spinal cord regulates thermal and mechanical pain thresholds after sciatic nerve injury. *Submitted.*

(8) **Schaeffer V.**, Patte-Mensah C., Eckert A. and Mensah-Nyagan A.G. Sciatic nerve injury induces apoptosis of dorsal root ganglion satellite cells and selectively modifies neurosteroidogenesis in sensory neurons. *In preparation.*

<b>COMMUNICATIONS in international and national MEETINGS</b>
--

### ORAL COMMUNICATIONS:

#### - 2006 -

**Schaeffer V.**, Mensah-Nyagan A.G. Biosynthèse de stéroïdes sexuels dans les neuroblastomes humains : modulation par la transfection de protéines contrôlant la neurodégénérescence.

Journée scientifique de l'IFR 37 de Neurosciences sur le thème Stéroïdes sexuels et système nerveux (Strasbourg, France. 23 Mai 2006).

**Schaeffer V.**, Mensah-Nyagan A.G. Action potentielle des neurostéroïdes dans la prévention et le traitement des maladies neurodégénératives.

Workshop Neurex « Maladie d'Alzheimer : le point sur les recherches ». Strasbourg, France. 7 Octobre 2006.

#### - 2007 -

**Schaeffer V.**, Mensah-Nyagan A.G. Endogenous neurosteroids and neuroprotection in Alzheimer's disease and chronic pain.

Neurobiology and Chronobiology Laboratories Meeting (Basel, Switzerland, May 8<sup>th</sup>, 2007)

**ABSTRACTS:****- 2004 -**

(1) Robert I., Al Bersaoui R., **Schaeffer V.**, Lutz Y., Blanc F., Aunis D., Fuchs J.P. Doppel gene expression and Purkinje-cell degeneration in ataxic prion-deficient mice. Neurex Annual Meeting (Freiburg, Germany, 2004).

**- 2005 -**

(2) Patte-Mensah C., Kibaly C., Boudard D., **Schaeffer V.**, Béglé A., Saredi S. and Mensah-Nyagan A.G. Effect of chronic pain on the local production of neurosteroids in spinal neural networks. International Meeting Steroids and Nervous System (Torino, Italy, February 2005).

(3) Patte-Mensah C., Kibaly C., **Schaeffer V.**, Boudard D., Béglé A. and Mensah-Nyagan A.G. Expression and biological activity of cytochrome P450<sub>scc</sub> in the spinal cord under neuropathic pain state. Société des Neurosciences Meeting (Lille, France, May, 2005).

**- 2006 -**

(4) **Schaeffer V.**, Patte-Mensah C., Eckert A., Mensah-Nyagan A.G. Modulation of neurosteroid production by tau and amyloid precursor protein in human neuroblastoma cells. Neurex Annual Meeting (Basel, Switzerland, March, 2006).

(5) **Schaeffer V.**, Patte-Mensah C., Eckert A., Mensah-Nyagan A.G. Expression of Alzheimer's disease key proteins modifies neurosteroid production in human neuroblastoma cells. Society for Neuroscience Annual Meeting (Atlanta, Georgia, USA, October 14-18, 2006).

**- 2007 -**

(6) **Schaeffer V.**, Patte-Mensah C., Eckert A., Mensah-Nyagan A.G. Effects of Beta amyloid peptide 1-42 and oxidative stress on neurosteroid formation in human neuroblastoma cells. 4<sup>th</sup> International Meeting Steroids and Nervous System (Torino, Italy, February 17-21, 2007).

(7) Mensah-Nyagan A.G., Meyer L., Kibaly C., **Schaeffer V.**, Patte-Mensah C. Neurosteroids and nociceptive sensitivity in neuropathic rats. 4<sup>th</sup> International Meeting Steroids and Nervous System (Torino, Italy, February 17-21, 2007).

<b>PRIZES</b>
---------------

**- 2007 -**

**Poster prize** on the 4<sup>th</sup> International Meeting Steroids and Nervous System, Torino, Italy, February 17-21, 2007.

<b>TEACHING EXPERIENCES</b>
-----------------------------

**Courses teaching**

**2005:** Courses in Biology (Sensory Systems) for Bachelor's degree students.

**Junior advisor of trainees in laboratory works**

**2005:** Mr Lacaud Adrien and Mr Penichon Julien for Pulse-cha